

**PROTEINASES CISTEÍNICAS E INIBIDORES DE PAPAÍNA DURANTE O  
DESENVOLVIMENTO DAS SEMENTES DE Vigna unguiculata (L) Walp.  
CV. PITIÚBA.**

**KÁTIA VALEVSKI SALES FERNANDES**

**DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA,  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE EM BIOQUÍMICA.  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**FORTALEZA - 1990**

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 de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

---

Kátia Valevski Sales Fernandes

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 

---

---

José Xavier Filho

---

Iracema Lima Ainouz

---

José Tarquínio Prisco

- A **DEUS** pela dádiva de vida e força para a concretização de sonhos;
- À **minha família** pelos ensinamentos de fé e perseverança na busca do ideal e da verdade.

## AGRADECIMENTOS

Ao final de um trabalho é também chegado o momento de resgatar, com satisfação, a contribuição de todos que nos ajudaram na sua execução. Em particular, gostaria de agradecer:

- Ao **Professor José Xavier Filho**, pela orientação dedicada, paciente e estimulante.

- Ao **Professor Francisco de Assis Paiva Campos**, pela deposição de confiança em meu projeto pessoal de vida.

- Ao **Dr. Robert Thornburg**, pela colaboração no fornecimento de materiais utilizados nesta tese.

- Ao **Rômulo**, pela cumplicidade de sonhos e realizações.

- Aos **amigos sinceros Rita, Meg, Kátia Lopes, Mércia e Manoel Antônio**, pelo compartilhar de idéias e emoções.

- À **colega de trabalho Renata do Val**, pela fiel contribuição nas investigações de campo e laboratório.

- A **Francisco Costa e Luís Peres**, por sua participação na determinação de atividades inibitórias nas sementes aqui estudadas.

- A **Zey Bivar**, pelos serviços prestados em nosso laboratório e, em particular, neste trabalho de tese.

- Aos **colegas de turma (87.1)** pela convivência estimulante e pelas boas horas de estudo que não serão jamais esquecidas.

- Aos **Professores do Departamento de Bioquímica**, pela troca de conhecimentos e experiências.

- Aos **demais amigos do Departamento de Bioquímica**, em especial aos que fazem o Laboratório 2038, pelo estímulo constante.

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através de bolsa de Pós-Graduação concedida ao autor e de auxílios ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de auxílios ao curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará.

Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP/PADCT), pelo convênio com o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará através do projeto "Bases Bioquímicas da Resistência de Sementes a Insetos".

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

Comissão das Comunidades Européias, pelo convênio com o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará através do projeto "Identificação e

Caracterização de Proteínas e cDNAs que determinam Resistência a Insetos em Caupi e Outros Grãos de Leguminosas".

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<u>LISTA DE FIGURAS</u> .....	<i>xii</i>
<u>LISTA DE TABELAS</u> .....	<i>xv</i>
<u>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</u> .....	<i>xvi</i>
<u>RESUMO</u> .....	<i>xviii</i>
<u>ABSTRACT</u> .....	<i>xx</i>
1 - <u>INTRODUÇÃO</u> .....	1
2 - <u>MATERIAIS</u> .....	19
3 - <u>MÉTODOS</u> .....	24
3.1 - <u>Expressão de Proteinases Cisteínicas e Inibidores de Papaína durante o Desenvolvimento das Sementes</u> .....	24
3.1.1 - Determinação de Peso Fresco e Peso Seco ...	25
3.1.2 - Preparação dos Extratos .....	25
3.1.3 - Preparação de Sepharose CM-Papaína .....	26
3.1.4 - Curva de Saturação da Sepharose CM-Papaína.	27
3.1.5 - Cromatografia de Afinidade em Sepharose CM-Papaína .....	28
3.1.6 - Dosagem da Atividade de Proteinases Cisteínicas .....	28
3.1.7 - Determinação de Atividade Inibitória contra Papaína .....	29
3.1.8 - Determinação dos Inibidores de Papaína em Eixos em Desenvolvimento .....	30

	<b>Página</b>
3.1.8.1 - Preparação de Antisoros contra Inibidores de Papaína .....	30
3.1.8.2 - Purificação dos Anticorpos por Cromatografia de Afinidade em Sepharose CL-4B Proteína A .....	31
3.1.8.3 - Técnica de "Dot Blot" para Avaliação dos Inibidores de Papaína em Eixos e Cotilédones em Desenvolvimento .....	32
3.2 - <u>Análise Comparativa dos Níveis de Inibidores de Papaína e Tripsina em Sementes de Diferentes Espécies</u> .....	34
3.2.1 - Preparação dos Extratos .....	34
3.2.2 - Atividades Proteinásicas e Inibitórias ..	35
3.2.2.1 - Papaína .....	35
3.2.2.2 - Tripsina .....	36
3.2.2.3 - Inibidores de Papaína .....	37
3.2.2.4 - Inibidores de Tripsina .....	37
3.2.3 - Análise dos Inibidores de Papaína e Tripsina por "Dot Blot" .....	38
3.2.3.1 - Precipitação por Sulfato de Amônio ....	38
3.2.3.2 - Preparação de Antisoros .....	38
3.2.3.3 - Purificação de Anticorpos contra Inibidores de Tripsina .....	39
3.2.3.4 - "Dot Blot" para Avaliação dos Inibidores de Papaína e Tripsina nas Sementes.	39
3.3 - <u>Purificação Parcial dos Inibidores de Papaína em Sementes Quiescentes de Feijão-de-</u>	

	<b>Página</b>
corda Pitiúba .....	40
3.3.1 - Purificação dos Inibidores .....	40
3.3.2 - Determinação de Proteínas, Atividades Enzimáticas e Inibitórias .....	43
3.3.2.1 - Determinação de Proteínas .....	43
3.3.2.2 - Atividade de Papaína .....	44
3.3.2.3 - Atividade de Proteinases Cisteínicas Endógenas .....	44
3.3.2.4 - Atividade de Inibidores de Papaína ...	45
4 - <u>RESULTADOS</u> .....	46
4.1 - <u>Desenvolvimento do Fruto</u> .....	46
4.2 - <u>Expressão de Proteinases Cisteínicas e</u> <u>Inibidores de Papaína Durante o Desenvol-</u> <u>vimento do Fruto de Vigna unguiculata cv.</u> <u>pitiúba</u> .....	53
4.2.1 - Curva de Saturação de Sepharose CM-Pa- paína .....	53
4.2.2 - Cromatografia de Afinidade em Sepharose CM-Papaína .....	53
4.2.3 - Dosagem da Atividade de Proteinases Cisteínicas .....	57
4.2.4 - Atividade Inibitória contra Papaína em Cotilédones em Desenvolvimento .....	57
4.2.5 - Avaliação dos Inibidores de Papaína em Cotilédones e Eixos em Desenvolvimento, por "Dot Blot" .....	60

	Página
4.3 - <u>Análise Comparativa entre os Níveis de Inibidores de Papaína e Tripsina em Sementes de Diferentes Espécies</u> .....	65
4.3.1 - Análise dos Níveis de Inibidores por Ensaio Enzimático .....	65
4.3.2 - "Dot Blot" para Avaliação de Inibidores de Papaína e Tripsina em Sementes .....	65
4.4 - <u>Purificação Parcial dos Inibidores de Papaína em Sementes Quiescentes de Feijão-de-corda Pitiúba</u> .....	68
4.4.1 - Titulação de Papaína por Cistatina .....	74
4.4.2 - Titulação de Proteinases Cisteínicas em Sementes Quiescentes de Feijão-de-corda Pitiúba .....	77
5 - <u>DISCUSSÃO</u> .....	79
6 - <u>CONCLUSÕES</u> .....	86
7 - <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> .....	88

## LISTA DE FIGURAS

<u>FIGURA</u>		<u>Página</u>
1	Etapas de purificação dos inibidores de papaína em sementes quiescentes de <u>Vigna unguiculata</u> cv. pitiúba .....	41
2	Variação de peso fresco durante o desenvolvimento das sementes de <u>Vigna unguiculata</u> cv. pitiúba .....	48
3	Variação de peso seco durante o desenvolvimento das sementes de <u>Vigna unguiculata</u> cv. pitiúba .....	50
4	Desenvolvimento do fruto de <u>Vigna unguiculata</u> cv. pitiúba durante o desenvolvimento. (A) Alterações de peso fresco. (B) Alterações de peso seco ...	51
5	Curva de saturação de Sepharose CM-papaína .....	54
6	Cromatografias de afinidade em Sepharose CM-papaína dos extratos de cotilédones ao longo do desenvolvimento .....	55
7	Atividade de proteinases cisteínicas em cotilédones de <u>Vigna unguiculata</u> cv. pitiúba em desenvolvimento .....	57

**FIGURAS**

**Página**

8	Atividade inibitória contra papaína em cotilédones de <u>Vigna unguiculata</u> cv. pitiúba em desenvolvimento .....	62
9	"Dot Blot" de inibidores de papaína em cotilédones com 4, 8, 9, 10, 11, 12 13, 14 e 17 DAPs de <u>Vigna unguiculata</u> cv. pitiúba .....	63
10	"Dot Blot" de inibidores de papaína com 8, 9, 10, 11, 13 e 16 DAPs em eixos de <u>Vigna unguiculata</u> cv. pitiúba .	64
11	"Dot Blot" de inibidores de papaína em seis sementes de plantas de diferentes espécies .....	69
12	"Dot Blot" de inibidores de papaína em seis cultivares de <u>Vigna unguiculata</u> .....	70
13	"Dot Blot" de inibidores de tripsina em seis cultivares de <u>Vigna unguiculata</u> .....	71
14	Cromatografia de afinidade em Sepharose CM-papaína da fração $S_2F_{II}^{CM}$ .....	73
15	Curva de titulação de papaína, por cistatina, utilizando caseína como substrato .....	75
16	Curva de titulação de papaína, por cistatina, utilizando APANA como substrato .....	76

**FIGURA**

**Página**

- 17 Curva de titulação de proteinases cisteí-  
nicas de sementes quiescentes de Vigna  
unquiculata cv. pitiúba, por cistatina,  
usando APANA como substrato .....

78

## LISTA DE TABELAS

<u>TABELA</u>	<u>Página</u>
1 Plantas investigadas - classificação, denominação científica e vulgar .....	22
2 Peso fresco do fruto de <u>Vigna unguiculata</u> (L) Walp. cv. pitiúba durante o desenvolvimento .....	47
3 Peso seco do fruto de <u>Vigna unguiculata</u> cv. pitiúba durante o desenvolvimento ....	52
4 Atividade de proteinases cisteínicas em cotilédones de <u>Vigna unguiculata</u> cv. pitiúba durante o desenvolvimento .....	58
5 Atividade inibitória contra papaína em cotilédones de <u>Vigna unguiculata</u> cv. pitiúba durante o desenvolvimento .....	61
6 Atividade inibitória contra papaína em sementes de plantas de diferentes espécies .	66
7 Atividade inibitória contra tripsina em sementes de plantas de diferentes espécies	67
8 Etapas de purificação dos inibidores de papaína em sementes quiescentes de <u>Vigna unguiculata</u> cv. pitiúba .....	72

## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

APANA	-	Acetil-fenilalanil-arginina-p-nitroanilida
BSA	-	Albumina sérica bovina
BTCI	-	Inibidor de tripsina de feijão-de-corda pitíuba
cDNA	-	DNA complementar
CIS	-	Cistatina de clara de ovo de galinha
CM	-	Carboximetil
CnBr	-	Brometo cianogênico
CPI	-	Inibidor de papaína de feijão-de-corda pitíuba
cv.	-	Cultivar
DAP	-	Dia após a polinização
DEAE	-	Dietilaminoetil
DTT	-	Ditiotreitol
EDTA	-	Ácido etilenodiaminotetracético
HRP	-	Peroxidase de rábano-bastardo
IgG	-	Imunoglobulina
mRNA	-	RNA mensageiro
PAGE	-	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PVP	-	Polivinilpirrolidona
SBTI	-	Inibidor de tripsina de soja
SDS	-	Dodecil sulfato de sódio
TCA	-	Ácido tricloroacético

TRIS	-	Tri (hidroximetil)-amino metano
UDO	-	Unidade de densidade ótica
UI	-	Unidade de inibidor
UPC	-	Unidade de proteinase cisteínica
VIC	-	Vicilina de feijão-de-corda pitiúba

## RESUMO

A observação da expressão das proteinases cisteínicas durante o desenvolvimento das sementes de Vigna unguiculata (L) Walp. cv. pitiúba revelou dois mínimos de atividade (8 e 12 DAP) e dois picos de atividade máxima destas enzimas, correspondentes aos dias 6 e 10 após a polinização. Nestes dias, bem como no 16º DAP, foram observados os menores valores de atividade inibitória contra papaína durante o desenvolvimento dos cotilédones; nos dias 8 e 14 foram detectados os maiores níveis de expressão destes inibidores. Esta expressão coordenada dos inibidores de papaína e suas possíveis enzimas-alvo reforça a idéia da participação desses inibidores nos processos de regulação da atividade de enzimas proteolíticas endógenas em sementes (ASTHON, 1976; RYAN & WALKER - SIMMONS, 1981; MIKOLA, 1983). O acompanhamento, por "dot blot", dos inibidores em eixos, demonstrou resultados semelhantes aos encontrados por CARASCO & XAVIER-FILHO (1981) para os inibidores de tripsina, onde níveis sempre levemente crescentes foram observados durante o desenvolvimento.

Uma fração rica em inibidores de papaína, presentes em sementes quiescentes de feijão-de-corda pitiúba, foi purificada, por cromatografia de afinidade em Sepharose CM-papaína, em 7.931 vezes.

Os níveis de inibidores de papaína, nestas sementes, foram estimados em 0,4 $\mu$ g/mg de peso seco. Atividade de proteinases cisteínicas também foi evidenciada em sementes quiescentes de feijão-de-corda pitiúba e foi computada uma quantidade total de 0,052 $\mu$ g/mg de peso seco.

As determinações quantitativas de inibidores de papaína e tripsina em sementes de 23 espécies de plantas indicaram uma menor variação dos níveis dos primeiros do que dos níveis dos últimos inibidores. Nenhuma correlação parece existir entre os níveis dos inibidores de ambas as classes de proteinases e o grau evolutivo destas plantas. Destacam-se as sementes de Leguminosas como as que apresentaram os maiores níveis de inibidores de papaína e tripsina.

## ABSTRACT

Observation of the expression of cysteine proteinases during seed development in Vigna unguiculata (L) Walp. cv. pitiúba showed two minima of activity (8 and 12 days after polinization) and two peaks of maximal activity (6 and 10 DAP). These last correspond to the lowest values of papain inhibitor activity during cotyledon development; the maximal activity of these inhibitors has been determined at 8 and 14 days after fertilization. This coordinate expression of papain inhibitors and their possible target-enzymes confirm the idea of the participation of these inhibitors in the regulation of endogenous proteolytic enzyme activities in seeds (ASHTON, 1976; RYAN & WALKER-SIMMONS, 1981; MIKOLA, 1983).

The development of inhibitor activity in the axes, through a "dot blot" methodology, showed similar results as those reported by CARASCO & XAVIER-FILHO (1981) for trypsin inhibitors in the same organs, when slightly increasing levels were noticed during development.

A fraction rich in papain inhibitors activity found in mature cowpea seeds was purified 7.931 times by affinity chromatography in Sepharose CM-papain.

The papain inhibitor levels in cowpea seeds, as

titrated by cystatin, were estimated at 0,4 $\mu$ g/mg dry weight. Cysteine proteinase activity was also evident in mature seeds with a level of 0,052 $\mu$ g/mg dry weight as titrated by chicken cystatin.

Quantitative determinations of papain and trypsin inhibitors in seeds of 23 different species of plants showed a lower variation for the levels of the former inhibitors than for levels of the latter ones. No correlation seems possible between the levels of both inhibitors and evolutive position of these plants; seeds of Leguminosae showed the highest levels of papain and trypsin inhibitors.

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - Considerações Gerais

Inibidores naturais de enzimas proteolíticas formam um grupo multifamiliar de proteínas, ubíquas na natureza (LASKOWSKI & KATO, 1980). Representam, em plantas, em torno de 1 a 15% ou mesmo uma proporção maior da proteína total de órgãos de reserva, tais como sementes e tubérculos (RYAN, 1973); em algumas espécies estão também presentes em folhas, em frutos ou em ambos. Muitos dos inibidores de proteinases já identificados apresentam atividade inibitória contra cada uma das quatro classes mecanísticas de endopeptidases conhecidas. Estas enzimas, classificadas de acordo com a natureza funcional dos grupos responsáveis por sua ação catalítica são: proteinases serínicas, proteinases cisteínicas, proteinases ácidas aspárticas e metaloproteinases (STOREY & WAGNER, 1986). Os dados percentuais, acima mencionados, aliados ao fato de que as proteinases são frequentemente de origem animal, tornam os inibidores prováveis fatores antinutricionais bastante comuns em plantas. A pesquisa sobre esses inibidores tem se intensificado bastante nos últimos anos como uma tentativa de responder a questões concernentes à sua estrutura, papel fisiológico e mecanismo de ação.

A discussão em torno do papel biológico dessa classe de proteínas, em especial, tem sido, sem dúvida, tema de

debate e interesse consideráveis por parte de uma ampla gama de especialistas, tais como: bioquímicos, farmacologistas, nutricionistas, fisiologistas, etc. Estes pesquisadores, consensualmente, admitem, na atualidade, não um único papel, mas uma multiplicidade de funções desempenhadas por esses inibidores (XAVIER-FILHO & CAMPOS, 1989).

É fato conhecido que as pesquisas envolvendo inibidores de proteinases serínicas têm recebido muito mais atenção que as dirigidas a outros inibidores de proteinases, até porque a natureza parece ter dedicado mais de seu tempo à criação das, no mínimo, 13 famílias conhecidas de inibidores de endopeptidases serínicas (RYAN, 1989). Em contrapartida, há uma única super-família de inibidores de proteinases cisteínicas, que são distribuídos em somente três famílias distintas e recentemente definidas, presentes em animais, vegetais e microrganismos (BARRETT, 1987).

## 1.2 - Identificação e Isolamento de Inibidores de Proteinases Cisteínicas: Uma Revisão Histórica.

O isolamento e purificação de inibidores de proteinases cisteínicas vem sendo obtido pela utilização combinada de uma série de técnicas-padrão para separação de proteínas.

Vários destes inibidores já foram identificados até o presente momento, em diferentes tecidos vegetais, tais como: inibidor de bromelina em caule de abacaxi (PERLSTEIN & KEZDY, 1973), inibidor de papaína e enzimas relacionadas, em tubérculos de batata (RODIS & HOFF, 1974), inibidor de

uma peptidohidrolase de vicilina ("vicilin peptidohydro-lase"), uma peptidohidrolase presente em cotilédones de Vigna radiata (BAUMGARTNER & CHRISPPEELS, 1976; 1977), inibidor de quimiopapaína na forma de cristais cúbicos presentes em folhas de tomate (AKERS & HOFF, 1980), inibidor específico de proteinases cisteínicas do tipo papaína em endosperma de milho (ABE et al., 1980), inibidor de papaína e enzimas cisteínicas relacionadas em sementes de Vigna unguiculata subsp. cylindrica (RELE et al., 1980), inibidor de proteinases cisteínicas em sementes germinantes de pinheiro escocês (SALMIA, 1980), inibidor de proteinases cisteínicas de sementes germinantes de cevada (MIKOLA, 1983), inibidor de papaína e ficina em sementes de arroz (ABE & ARAI, 1985), inibidor inespecífico de proteinases do tipo cisteínica em sementes de Enterolobium contortisiliquum (OLIVA et al., 1987) e inibidor de papaína, ficina e bromelina em sementes de abóbora-moranga (ZIMACHEVA et al., 1988).

O primeiro grupo de isoinibidores específicos contra papaína e proteinases cisteínicas relacionadas, isolado a partir de plantas, foi obtido de sementes de Vigna unguiculata subsp. cylíndrica, onde estão presentes em quantidades muito menores que os inibidores de proteinases serínicas do tipo tripsina e subtilisina (RELE et al., 1980). Foi possível, nestas sementes, a separação e purificação dos isoinibidores A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>2</sub> bem como purificação parcial de C, após fracionamento com sulfato de amônio a vários intervalos de saturação, cromatografias em CM-celulose, DEAE-celulose, Sephadex G-100 e eletroforese em gel de poliacri-

lamida em presença de SDS. O iso-inibidor B<sub>1</sub>, também presente, não foi purificado devido à sua instabilidade. Foi constatado ainda neste trabalho de RELE et al. (1980), que em sementes de 12 espécies e 21 culturas de tecido vegetais diversos os inibidores de papaína estiveram sempre presentes, o que não ocorreu com os inibidores de tripsina e subtilisina. Mostraram ainda os investigadores (RELE et al., 1980) que as 21 culturas de tecido testadas apresentaram um aumento notável da atividade inibitória de papaína após aquecimento a 98°C por 7 min, sugerindo um inibidor latente, liberado por aquecimento, provavelmente devido à destruição de uma enzima ou proteína que mascara parte ou toda a atividade inibitória em extratos frescos.

Em 1985, a purificação do inibidor de proteinases cisteínicas de arroz foi obtida pela utilização seqüencial das seguintes técnicas: aquecimento do extrato bruto, precipitação por sulfato de amônio, cromatografias em CM-Sephadex C-50, Sephadex G-75, DEAE-Sephadex A-50 e novamente Sephadex G-75. Realizou-se ainda eletroforese analítica, em gel de poli-acrilamida na ausência e presença de SDS, bem como focalização isoelétrica (ABE & ARAI, 1985). Mais recentemente, em 1987, o gene para este inibidor foi clonado e o inibidor classificado como uma cistatina, passando a ser referido como orizacistatina (ABE et al., 1987a).

O método empregado para a purificação da cistatina de ovo de galinha, foi quase que exclusivamente, uma cromatografia de afinidade em Sepharose CM-papaína (ANASTASI et al., 1983), procedimento repetido com sucesso em 1987, na

purificação de inibidores de proteinases cisteínicas em sementes de Enterolobium contortisiliquum (OLIVA et al., (1987). O uso de uma enzima ligante em sua forma carboximetilada acentuou a afinidade entre inibidor e enzima.

Um método semiquantitativo de gel em placa caseína-ágar foi empregado para a detecção de um inibidor de quimiopapaína em folíolos de tomate (AKERS & HOFF, 1980).

Em alguns casos, sabe-se que um mesmo órgão ou tecido vegetal pode apresentar mais de um tipo de inibidor específico para cada um dos diversos tipos de proteinases. Um processo de isolamento desenvolvido para estes casos foi a separação seqüencial pelo uso de enzimas ligadas ordenadamente em um tipo de "cromatografia de afinidade seqüencial" (XAVIER-FILHO & CAMPOS, 1989).

Mais recentemente, em 1988, uma técnica de "Western blotting" foi empregada na purificação de um inibidor de proteinases cisteínicas presente na célula do protozoário Dictyostelium discoideum. Este foi o primeiro exemplo do uso desta técnica como um método preparativo para a purificação de um polipeptídeo em seu estado ativo, ao contrário do seu emprego usual, até então, na avaliação de interações entre proteínas e anticorpos (KORTH et al., 1988). Apesar do exemplo não tratar de inibidor de origem vegetal, achamos relevante a citação desta técnica empregada recentemente e com inquestionável sucesso.

A orizacistatina, mencionada anteriormente, foi o primeiro inibidor de origem vegetal incluído na classifi-

cação proposta no "First International Symposium on Cysteine Proteinases and Their Inhibitors", realizado em setembro de 1985, na Iugoslávia (BARRETT et al., 1986). Neste encontro ficou estabelecido que as proteínas comprovadamente relacionadas, a nível evolutivo, com a cistatina de ovo de galinha formariam uma super-família das cistatinas. Estas proteínas estariam compreendidas em três diferentes famílias: a família 1, freqüentemente tratada como a das estefinas, onde os inibidores são desprovidos de pontes dissulfeto em sua estrutura e apresentam peso molecular aproximado a 11.000 daltons; a família 2, de inibidores com peso molecular de aproximadamente 13.000 daltons e que contêm ainda dois "loops" de pontes dissulfeto próximos à extremidade carboxílica; e, finalmente, a família 3, também referida como a dos cininogênios. Os inibidores desta última família são bem maiores, de peso molecular acima de 40.000 daltons e apresentam seis "loops" de pontes dissulfeto, claramente resultantes de duas duplicações do material genético da cistatina do tipo 2. São ainda moléculas glicosiladas e em sua extremidade carboxílica têm um polipeptídeo adicional que contém a seqüência de aminoácidos da bradicinina, polipeptídeo com importante papel no processo de coagulação sangüínea. Todas as cistatinas destas três famílias conservam a seqüência Gln-Val-Val-Ala-Gly ou seus homólogos, devendo esta seqüência estar provavelmente envolvida na inibição de proteinases cisteínicas (BARRETT, 1987).

### 1.3 - Propriedades Físicas, Químicas e Estruturais de Inibidores de Proteinases Cisteínicas

Como os inibidores protéicos de enzimas proteolíticas em geral, os inibidores de proteinases cisteínicas, também chamados em conjunto 'cistatinas' apresentam como propriedades básicas, resistência ao calor, a extremos de pH e à hidrólise enzimática, graças à estabilidade de sua estrutura tridimensional dada por pontes dissulfeto. Apresentam alto conteúdo de resíduos de meia-cistina, baixo percentual dos aminoácidos Met, His e Trp e são ricos nos aminoácidos ácidos Asp e Glu e em resíduos de Ser e Lys. Apresentam ainda largo intervalo de peso molecular, indo de 5.000 daltons de um inibidor de Vigna unguiculata subsp. cylíndrica a 80.000 daltons do inibidor de batata (XAVIER-FILHO & CAMPOS, 1989). São inibidores competitivos, reversíveis, com constantes de associação geralmente muito altas e semelhantes, em magnitude, às de proteinases serínicas associadas a seus inibidores específicos (RYAN, 1989).

VARTAK et al., em um estudo de três grupos de inibidores presentes em plantas, quais sejam, de tripsina - quimiotripsina, de subtilisina e de papaína, concluíram que esses inibidores assemelhavam-se bastante. Esta conclusão baseou-se em algumas características apresentadas por cada um desses grupos, tais como: valores de peso molecular, estabilidade a certas condições desnaturantes e especificidades às respectivas enzimas. Os dois primeiros grupos de inibidores de proteinases serínicas se assemelham em seu modo de ação, diferindo apenas nas quantidades muito

superiores de inibidores de tripsina em relação aos de subtilisina, nas sementes. Já os inibidores de proteinases cisteínicas distinguem-se, em vários aspectos, dos de proteinases serínicas: ocorrem em maior número de gêneros de plantas e em várias culturas de células em divisão e crescimento ativo, apesar de em quantidades muito menores que os inibidores de tripsina; têm pontos isoelétricos mais altos; se ligam a derivados de enzimas cataliticamente inativos; e aparentemente diferem de ambos os grupos de inibidores de proteinases serínicas em seu mecanismo de ação (RELE et al., 1980; VARTAK et al., 1980).

Os isoinibidores de bromelina amplamente estudados e isolados a partir de caule de abacaxi, foram caracterizados como inibidores de dupla cadeia, que, possivelmente, teriam se originado de clivagem das ligações peptídicas do provável sítio reativo (Arg-Glu e Gln-Asp). Suas seqüências de aminoácidos foram determinadas e observou-se que suas atividades inibitórias eram inespecíficas contra bromelina, ficina e até tripsina, em menor intensidade. O peso molecular de um deles foi estimado em 5.600 daltons (HEINRIKSON & KEZDY, 1976).

Quanto aos isoinibidores A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>2</sub> e C purificados a partir de sementes de V. unguiculata subsp. cylindrica, demonstrou-se que eram específicos contra papaína, quimiopapaína e ficina, não apresentando nenhum efeito inibitório sobre bromelina, pepsina, quimiotripsina, tripsina e subtilisina (RELE et al., 1980). Os pesos moleculares des-

ses inibidores, determinados por SDS-PAGE, variaram desde 5.000 daltons até 12.000 daltons (VARTAK et al., 1980).

O inibidor de proteinases cisteínicas isolado a partir de sementes de Enterolobium contortisiliquum mostrou atividade inibitória inespecífica contra papaína, bromelina e fraca contra tripsina. Como outros inibidores, mostrou-se estável a extremos de pH e resistente a temperatura de 60°C. Seu peso molecular, determinado por SDS-PAGE e filtração em Sephadex G-75, foi de 60.000 daltons, sendo, portanto, o segundo inibidor de proteinases cisteínicas de maior peso molecular (OLIVA et al., 1987).

Outro inibidor visto como sendo especificamente ativo contra papaína e ficina, denominado CI-4a, foi isolado a partir do endosperma de milho por ABE & WHITAKER em 1988. De peso molecular estimado em 9.200 daltons (por SDS-PAGE) e ponto isoelétrico 5,2 (por focalização isoelétrica), esta proteína mostrou-se estável a tratamento por calor em 100°C por 60 min e relativamente estável em condições ácidas ou alcalinas. Considerando-se todas essas propriedades o inibidor de milho mostrou-se semelhante à orizacistatina (ABE & WHITAKER, 1988).

Já o inibidor isolado a partir de sementes de abóbora-moranga mostrou-se ativo contra papaína, ficina e bromelina, sem exibir qualquer atividade inibitória contra proteinases serínicas, aspárticas e metaloproteinases. Seu peso molecular, por SDS-PAGE, foi de 6.000 daltons sendo, portanto, o segundo menor inibidor de proteinases cisteí-

nicas de origem vegetal, conhecido. Utilizando-se focalização isoelétrica, identificaram-se três formas do inibidor nestas sementes, cujos valores de pI foram 5,9; 7,5; 10,3 (ZIMACHEVA et al., 1988).

Pelo seqüenciamento de aminoácidos e por clonagem de cDNAs, as estruturas das cistatinas estão pouco a pouco sendo elucidadas e, pela análise do cDNA da orizacistatina, nome dado à cistatina do arroz, observou-se uma homologia de seqüência significativa com as cistatinas animais. Este cDNA compunha-se de 598 pares de bases e seu produto gênico poderia classificar-se na família 1 da super-família de cistatinas, já que não contém pontes dissulfeto em sua estrutura. Poderia também situar-se na família 2, levando-se em consideração o número e localização de resíduos de aminoácidos idênticos (ABE et al., 1987a). A orizacistatina teve seu peso molecular estimado em torno de 12.000 daltons e ponto isoelétrico de 5,3, mostrando-se muito eficiente na inibição de papaína e ficina, mas não de bromelina ou qualquer proteinase serínica. Apresentou-se, ainda, estável em temperaturas abaixo de 100°C e em intervalo de pH entre 2,2 e 9,0 (ABE et al., 1987b).

#### **1.4 - Mecanismo de Interação de Cistatinas com Proteinases Cisteínicas**

A maior parte das proteinases cisteínicas inibidas por cistatinas apresentam peso molecular em torno de 25.000 daltons e forte homologia de seqüência com a papaína e são consideradas pertencentes à super-família papaína. Nesta

super-família estariam incluídas as proteinases vegetais papaína, quimiopapaína, ficina, actinidina e bromelina (BARRETT, 1987).

As cistatinas são inibidores competitivos e reversíveis, embora seja difícil demonstrar a natureza reversível desta reação ou a competição com o substrato de uma maneira direta, já que a afinidade destes inibidores por algumas de suas enzimas-alvo é muito alta. Uma particularidade notável desta interação é a capacidade de formação de complexos enzima-inibidor bastante firmes, mesmo quando o sítio catalítico da enzima é bloqueado por reagentes como iodoacetamida ou mercúrio ( $\text{Hg}^{2+}$ ). Neste ponto, as cistatinas diferem dos inibidores de proteinases serínicas, incapazes de formar complexos estáveis com enzimas bloqueadas, a nível de sítio ativo, por inibidores covalentes. Já em relação às constantes cinética e de equilíbrio, as cistatinas comportam-se, em suas interações específicas, de maneira semelhante aos inibidores de proteinases serínicas (BARRETT, 1987).

Um modelo de interação das cistatinas com proteinases cisteínicas foi recentemente proposto por BARRETT (1987). Neste modelo os inibidores apresentariam um sítio reativo do tipo substrato que interagiria fortemente com o sítio catalítico enzimático, além de uma área de contato secundária que contribuiria para a energia de ligação. O sítio reativo das cistatinas, segundo o modelo, seria a ligação peptídica do resíduo glicina, próximo à extremidade amino-terminal, comprovadamente conservado em todas as cis

tatinas até então seqüenciadas, sejam elas de origem vegetal ou animal. Já a região secundária de contato é postulada como sendo a seqüência também conservada nas cistatinas do tipo Gln-Val-Val-Ala-Gly (BARRETT, 1987). Apesar de alguns resultados experimentais suportarem o modelo descrito, estudos cristalográficos por raios-X deveriam ser feitos nos vários complexos formados entre as cistatinas e suas proteinases cisteínicas específicas, visando sua comprovação definitiva.

Avanços reais começam a surgir neste sentido. A estrutura cristalina da cistatina de clara de ovo de galinha foi determinada por difração de raios-X, bem como sugerido um modelo único de interação desta cistatina com a papaína, no qual 'loops' presentes na primeira molécula participam das principais ligações de interação com resíduos altamente conservados da enzima, situados na vizinhança de seu centro catalítico. O mecanismo proposto parece diferir fundamentalmente do padrão de interação já definido para os inibidores de proteinases serínicas e estas mesmas enzimas (BODE et al., 1988).

Uma estequiometria equimolar da ligação papaína-cistatina de galinha foi também recentemente estabelecida, em contraste com indicações anteriores de que duas moléculas de inibidor seriam necessárias à inibição de uma molécula de enzima. Uma constante de associação limitada inferiormente por volta de  $10^9 M^{-1}$  reflete a forte interação entre esta cistatina e a papaína (LINDAHL et al., 1988).

### 1.5 - Considerações Gerais Sobre o Papel Biológico dos Inibidores de Proteinases Cisteínicas

Em decorrência de esforços de pesquisa empreendidos na tentativa de elucidar a significação fisiológica dos inibidores protéicos de enzimas proteolíticas para as plantas, têm sido sugeridos os seguintes papéis para esta classe de proteínas: integrantes do conjunto de mecanismos de defesa contra herbivoria excessiva; controle da atividade proteolítica em tecidos vegetais; fonte, após exercido seu papel primário, de blocos construtivos para nova síntese de proteínas; e contribuição na dispersão endozóica das sementes (RICHARDSON, 1977, XAVIER-FILHO & CAMPOS, 1989).

Ao lado de outros mecanismos de controle operantes na mobilização de reservas protéicas, como controle hormonal da síntese de novo, zimógenos, compartimentalização, pH, especificidade ao substrato e inibição por produto final (ASHTON, 1976), uma breve consulta à literatura especializada mostra um papel de proteção contra proteólise indesejada, em sementes, para os inibidores de endopeptidases cisteínicas (principais enzimas responsáveis pela mobilização protéica durante a germinação (RYAN & WALKER-SIMMONS, 1981; SHUTOV & VAINTRAUB, 1987), bem como para os inibidores das três outras classes mecanísticas de proteinases, originalmente propostas por HARTLEY (RYAN, 1981) - serínicas, aspárticas e metaloproteinases (ASHTON, 1976; RYAN & WALKER-SIMMONS, 1981; MIKOLA, 1983). ABE et al. (1980), MIKOLA (1983) e SALMIA (1980) encontraram um declínio na atividade inibitória de proteinases cisteínicas durante a ger-

minação de milho, cevada e pinheiro escocês, respectivamente. NIELSEN & LIENER (1984) observaram um decréscimo na atividade inibitória contra papaína em cotilédones de Phaseolus vulgaris, durante a germinação. BAUMGARTNER & CHRISPEELS (1976) mostraram a importância de se comparar a cinética do aparecimento da atividade proteínásica e desaparecimento da atividade inibitória, bem como as localizações intracelulares das duas atividades. Estes últimos pesquisadores demonstraram que a atividade da peptidohidrolase de vicilina (endopeptidase cisteínica presente em cotilédones de Vigna radiata e envolvida na mobilização da proteína de reserva) aumentava muito lentamente nos três primeiros dias de germinação e rapidamente do quarto ao quinto dias, enquanto a atividade inibitória contra a mesma enzima diminuía gradualmente até o quinto ou sexto dia após a germinação. Mostraram ainda que a atividade endopeptidásica responsável pela proteólise dos corpos protéicos era detectada nestas próprias estruturas e a atividade inibitória no citossol. Por esses dados os autores consideraram improvável que os inibidores exercessem função regulatória na degradação dos corpos protéicos em Vigna radiata, mas que pudessem funcionar como proteção do citoplasma contra interrupção acidental dos corpos protéicos que abrigam as proteinases.

Por outro lado, a coexistência dos inibidores de proteinases cisteínicas e de proteinases do tipo papaína em tubérculos de batata levou RODIS et al (1974) a não descartarem a idéia de um papel de controle da atividade pro-

teolítica nestes órgãos, por parte dos inibidores.

RELE e colaboradores (1980), por sua vez, após observarem a ocorrência ubíqua dos inibidores de papaína nas sementes de doze espécies vegetais testadas, sugeriram um papel metabólico endógeno importante para esta classe proteica, além de uma possível ação protetora contra agressões eventuais. A ocorrência dos inibidores de proteinases serínicas em somente algumas dessas plantas exclui um papel básico para estes inibidores no crescimento e diferenciação celulares, processos primordiais a todas as espécies de plantas.

Mais uma evidência favorável ao papel de controle da atividade proteolítica endógena, em sementes, para os inibidores de proteinasescisteínicas surge do acompanhamento da expressão de mRNAs codificadores de orizacistatina e mRNAs codificadoras de glutelina (principal proteína de reserva do arroz) durante a maturação das sementes. O experimento revelou uma expressão coordenada dos dois mRNAs, refletindo a possível existência de um sistema de regulação da expressão gênica nestas sementes, para o controle da atividade proteolítica, desde a floração até o amadurecimento. Ressalte-se, ainda, que uma proteinase cisteínica foi detectada em sementes de arroz e que esta foi prontamente inibida *in vitro* por orizacistatina, em uma concentração equimolar (ABE *et al.*, 1987a) a exemplo da interação 1:1 entre cistatina de ovo de galinha e papaína (LINDAHL *et al.*, 1988).

Outra sugestão de significância potencial dos inibidores de proteinases cisteínicas tem sido dada pela recente evidência de que larvas de gorgulhos que proliferam em sementes de V. unguiculata, bem como besouros de batata do Colorado, parecem empregar proteinases cisteínicas como principais enzimas digestivas e, portanto, sobrevivem a dietas com altos níveis de inibidores de proteinases serínicas, mas não a altos níveis de inibidores de proteinases cisteínicas (RYAN, 1989). Entretanto, observações de que os inibidores de proteinases cisteínicas do tipo papaína, embora inibam completamente proteinases-SH in vitro, não estão relacionados com a resistência de certos cultivares de feijão-de-corda (TVu2027, IT81D 1064 e IT81D 1045) ao gorgulho Callosobruchus maculatus F., colocam em cheque a proposta do papel biológico acima suspeitado (XAVIER-FILHO et al., 1989).

A sugestão da atuação dos vários inibidores de enzimas proteolíticas como proteínas de reserva deriva, inicialmente, da constatação de sua presença em quantidades relativamente altas em órgãos de reserva como sementes e tubérculos. Esta hipótese é fortalecida pela observação, em algumas espécies, do decréscimo do nível de inibidores ao longo da germinação. Entretanto, em alguns casos, a presença dos inibidores só é verificada por alguns períodos de tempo, sugerindo então um possível papel temporário de reserva (XAVIER-FILHO, 1973).

Outra função proposta para os inibidores de enzimas

proteolíticas em geral pressupõe a sua contribuição na dispersão endozóica das sementes (RICHARDSON, 1977). Esta hipótese tem origem na observação de que pássaros ou outros animais herbívoros excretam, frequentemente, sementes com potencial de germinação. Sugere-se, nesse caso, que a ocorrência em concentrações relativamente altas de inibidores em sementes resguardaria estas estruturas da ação de enzimas proteolíticas atuantes no sistema digestivo dos animais.

#### **1.6 - Objetivos da Investigação**

Na perspectiva de melhorar a produtividade e a qualidade de plantas cultivadas, pesquisas de DNA recombinante têm fornecido novas e bem sucedidas técnicas de modificação genética em vegetais. Entretanto, a biologia molecular de plantas ainda se ressentem do pequeno número de genes identificados e isolados e tem seus horizontes limitados, no presente, por esta lacuna. Outro fator limitante à formulação de estratégias racionais para a manipulação genética de plantas é o entendimento completo dos sistemas a serem modificados, no que concerne à bioquímica, fisiologia e biologia molecular dos processos e das interações entre as plantas e seus ambientes (RYAN, 1989).

Este trabalho visa contribuir a essas investigações fornecendo novos dados ao reduzido conjunto de informações relativas à significância biológica dos inibidores de proteases cisteínicas. Estas proteínas são de relevante interesse na área de melhoramento vegetal, devido a sua atua-

ção potencial em processos defensivos e/ou regulatórios. Neste sentido, objetiva especificamente:

1) o acompanhamento da atividade de proteinases cisteínicas em sementes de Vigna unguiculata cv. pitiúba durante o desenvolvimento;

2) o acompanhamento da atividade inibitória contra papaína em sementes de V. unguiculata cv. pitiúba durante o mesmo período;

3) a correlação das atividades proteínásica e inibitória durante o desenvolvimento das mesmas sementes;

4) purificação parcial dos inibidores de papaína presentes em sementes quiescentes de feijão-de-corda pitiúba;

5) uma análise comparativa dos níveis de inibidores de papaína e tripsina em sementes de diferentes espécies de plantas.

## 2 - MATERIAIS

### 2.1 - Planta

Vigna unguiculata (L.) Walp. é uma planta da família Leguminosae, subfamília Papilionoidae, que tem germinação epigêia, sistema radicular formado por uma raiz principal, pivotante, com ramificações laterais e caule rastejante e trepador, caracterizado por uma haste principal, de crescimento determinado ou indeterminado, da qual se originam ramos. Acima dos cotilédones surge o primeiro par de folhas, simples e opostas, que exibem grande variação na sua forma e tamanho. Já as demais são compostas, trifolioladas e alternadas, sendo os folíolos de formas que variam de linear-lanceolada a ovalada. As flores são pediceladas, com pétalas brancas, amarelas, violetas, em diversas tonalidades. As vagens e sementes variam consideravelmente em forma, tamanho e cor (LIMA, 1980; WIEN & SUMMERFIELD, 1984).

### 2.2 - Semente

Sementes quiescentes de V. unguiculata (L.) Walp. cv. pitiúba foram fornecidas pelo Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

### 2.3 - Outras Plantas e Sementes

No transcurso da execução deste trabalho outras plantas, de classificação sistemática variada, foram inves-

tigadas. A seguir estão listadas as espécies com seus respectivos nomes vulgares e classificação, segundo BRAGA (1976) e SCHULTZ (1943), respectivamente (TABELA 1).

#### 2.4 - Reagentes

Papaína - Preparação cristalina. Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA.

Caseína - Preparada segundo Hammarsten. E. Merck S.A Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, Brasil.

Acetil-fenilalanil-arginina-p-nitroanilida (APANA) - Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brasil.

Cistatina - Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA.

L-Cisteína - E. Merck, Darmstadt, Alemanha.

DL-Ditiotreitól (DTT) - Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA.

Polivinilpirrolidona, Insolúvel (PVP) - Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA.

Peridrol (água oxigenada a 30%) - E. Merck, Darmstadt, Alemanha.

Brometo Cianogênico (CnBr) - De Haën Ag Seelze Hannover, Alemanha.

Conjugado de Peroxidase de Rábano-Bastardo com IgG de Cabra contra IgG de Coelho (Goat anti-Rabbit IgG Horse-radish Peroxidase (HRP) Conjugate) - Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif., EUA.

Reagente para Desenvolvimento de Cor de HRP (HRP Color Development Reagent) - Bio-Rad Laboratories,

Riachmond, Calif., EUA.

CM-celulose - E. Merck, Darmstadt, Alemanha.

Proteína-A Sepharose CL-4B - Sigma Chemical  
Company, St. Louis, EUA.

Sepharose-4B - Pharmacia AB, Uppsala, Suécia.

Os demais reagentes utilizados foram de grau ana-  
lítico e obtidos comercialmente.

**TABELA 1 - Plantas investigadas - classificação, denominação científica e vulgar.**

<u>CLASSIFICAÇÃO</u>	<u>NOME CIENTÍFICO</u>	<u>NOME VULGAR</u>
Subdivisão Gymnospermae		
Classe Coniferae	<u>Biota orientalis</u>	- (1) (2)
Família Pinaceae		
Subfamília Araucariineae	<u>Araucaria brasiliensis</u>	pinhão
Subfamília Abitineae	<u>Pinus maritima</u>	- (1)
	<u>Picea pungens</u>	- (1)
Família Taxaceae		
Subfamília Taxeae	<u>Taxus baccata</u>	- (1)
Subdivisão Angiospermae		
Classe Monocotyledonae		
Família Gramineae	<u>Oryza sativa</u>	arroz
	<u>Zea mays</u>	milho
	<u>Triticum sativum</u>	trigo
Classe Dicotyledonae		
Subclasse Choripetalae		
Família Leguminosae		
Subfamília Mimosoideae	<u>Adenantha pavonina</u>	carolina
	<u>Enterolobium contortisiliquum</u>	orelha-de-negro
Subfamília Caesalpinioideae	<u>Parkia sp.</u>	fava-de-vaca
	<u>Tamarindus indica</u>	tamarindo
Subfamília Papilionoideae	<u>Canavalia gladiata</u>	fava-contrá
	<u>Phaseolus vulgaris</u>	feijão comum
	<u>Vigna unguiculata</u> (3)	feijão-de-corda
	<u>Dioclea grandiflora</u>	mucunã
	<u>Glycine hispida</u>	soja
Família Anacardiaceae	<u>Anacardium occidentale</u>	caju
Família Guttiferae		
Subfamília Clusoideae	<u>Platonia insignis</u>	bacuri
Subclasse Simpetalae		
Família Solanaceae	<u>Solanum lycopersicum</u>	tomate
Família Cucurbitaceae	<u>Cucumis melo</u>	melão
	<u>Momordica charantia</u>	melão de S. Caetano
Família Compositae	<u>Helianthus annuus</u>	girassol

- (1) Sementes cujos nomes vulgares não constam nas bibliografias consultadas.
- (2) Semente cuja classificação completa não consta nas bibliografias consultadas.
- (3) Seis diferentes cultivares de Vigna unguiculata foram utilizados: CE-11, CE-31, CE-524 (fornecidos pelo Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará), IT81D 1045, IT81D 1064 e TVu 2027 (fornecidos pelo Centro Nacional de Pesquisa Arroz-Feijão - EMBRAPA, Goiânia).

Obs.: As demais sementes listadas foram obtidas comercialmente.

### 3 - MÉTODOS

#### 3.1 - Expressão de Proteinases Cisteínicas e Inibidores de Papaína Durante o Desenvolvimento das Sementes.

Plantas de Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. pitiúba foram cultivadas em terreno do Campus do Pici, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, Brasil, durante o período de março a junho de 1988. As primeiras flores surgiram oito semanas após o plantio das sementes e, desde então, foram diariamente etiquetadas. Considerou-se como data de polinização o dia em que as flores se apresentaram totalmente abertas. Foram coletadas vagens frescas, em diversos estágios de desenvolvimento, as quais foram selecionadas por uniformidade em peso e tamanho, contadas e suas sementes retiradas do fruto. Em cada vagem o número de sementes variou de 10 a 19. Dentre estas, as que se mostraram atrofiadas em relação às demais, numa mesma vagem, foram descartadas. As sementes escolhidas foram então pesadas e logo em seguida dissecadas e desmembradas em tegumento, cotilédones e eixo embrionário (eixo + plúmula). Estas partes e as vagens desprovidas de sementes (pericarpo) foram então pesadas separadamente e congeladas para posterior liofilização e armazenagem em congelador, até subsequente utilização.

No decorrer deste trabalho será referido como eixo

o conjunto de eixo + plúmula.

### **3.1.1 - Determinação de Peso Fresco e Peso Seco**

As vagens, em grupos de 30, logo após coletadas em campo, foram submetidas à pesagem, para obtenção da curva de peso fresco. Quanto às sementes, foram realizadas pesagens antes e após a separação das suas partes componentes, sendo que esta última determinação foi realizada sobre cada uma das partes previamente separadas, em amostras de 150 sementes. As determinações de peso seco foram efetuadas pela pesagem dos materiais após liofilização.

### **3.1.2 - Preparação dos Extratos**

Cotilédones e eixos liofilizados das sementes em desenvolvimento foram, separadamente, reduzidos a um fino pó em um almofariz. A obtenção dos extratos cotiledonários baseou-se em procedimentos descritos por CARASCO & XAVIER-FILHO (1981). As farinhas de cotilédones foram inicialmente tratadas com metanol 80% na proporção de 1:5 (p/v), durante 15 min. Filtrou-se o homogenato resultante e o resíduo da filtração foi tratado novamente com metanol 80%, na proporção de 1:5 (p/v), por 15 min, visando a remoção máxima de clorofila. Após mais uma filtração e evaporação do metanol, por secagem em jato frio de ar, as farinhas livres de clorofila foram extraídas em tampão fosfato 0,1M, NaCl 0,5M, pH 7,0, dessa vez em uma proporção de 1:10 (p/v), durante 2 horas, sob agitação. A solução foi então centrifugada a 8.540g por 20 min. Ao sobrenadante proveniente desta centrifugação deu-se o nome de Extrato I. As sementes de até

6 DAPS, como eram de tamanho muito reduzido e não puderam ser descascadas, foram extraídas em tampão fosfato 0,1M, NaCl 0,5M, pH 7,0, com PVP 1%, para evitar a ação de fenóis contidos nas cascas.

As farinhas obtidas dos eixos foram extraídas em tampão fosfato 0,1M, NaCl 0,5M, pH 7,6, numa proporção de 1:10 (p/v), durante 30 min. Após centrifugação a 8.540g por 20 min, os sobrenadantes resultantes foram denominados Extratos II.

Vagens e tegumentos não foram estudados neste trabalho

### 3.1.3 - Preparação de Sepharose CM-Papaína

Papaína (250mg) foi dissolvida em 37,5ml de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0, contendo EDTA 1mM e DTT de modo a se obter uma solução final de 2mM. Esta preparação foi mantida a 20°C durante 20 min, quando foi então adicionado ácido iodoacético sólido suficiente para dar uma concentração final de 10mM. A solução foi então dialisada durante a noite contra bicarbonato de sódio 0,1M, pH 9,0 (ajustado com NaOH) (BARRETT, 1981). Por este procedimento a papaína é convertida à sua forma carboximetilada (CM-papaína).

Sepharose-4B (250g) foi ativada com CnBr (10g) em tampão fosfato de potássio 5M, segundo metodologia descrita por PORATH *et al.* (1973).

Sepharose-4B ativada foi misturada à CM-papaína e

estas foram mantidas, a 20°C, por 15 horas, sob leve agitação. Procedeu-se, então, a uma filtração do gel e este foi levemente agitado com glicina 0,1M em bicarbonato de sódio 0,1M por 1 h. Após esse tempo o gel foi lavado com ácido acético 0,1M, pH 3,0, seguido de fosfato dissódico 0,1M, pH 11,0 e fosfato de sódio 0,1M com EDTA 1mM, pH 7,0 (BARRETT, 1981).

A Sepharose CM-papaína foi mantida neste último tampão com azida sódica 0,1% e armazenada em refrigerador.

A quantidade de proteína contida no primeiro filtrado após o acoplamento foi avaliada pelo método de BRADFORD (1976). O valor obtido indicou uma ligação de 0,85 mg de enzima por g de Sepharose, resultado considerado bastante satisfatório já que, segundo BARRETT (1981), a quantidade de proteína acoplada ao gel deve ser da ordem de 0,5mg/g de gel.

#### **3.1.4 - Curva de Saturação da Sepharose CM-Papaína**

Sementes quiescentes de feijão-de-corda pitiúba, desprovidas de tegumento, foram trituradas em liquidificador e moinho, sendo então peneiradas em tela de 40 Mesh. As farinhas obtidas foram extraídas em tampão fosfato 0,1M, NaCl 0,5M, pH 7,0, em uma relação de 1:0 (p/v) por 2h, sob agitação contínua. Após centrifugação a 8.540g por 20 min o sobrenadante obtido foi denominado Extrato III.

O gel de Sepharose CM-papaína (50ml) foi exaustivamente lavado com água para a remoção da azida sódica e pos-

teriormente equilibrado com tampão fosfato 0,1M, NaCl 0,5M, pH 7,0. O Extrato III foi então adicionado ao gel e mantido em contato com este por 2h, em câmara fria (8°C). Após esse período, montou-se uma coluna que foi lavada com o tampão de equilíbrio até a remoção das proteínas não adsorvidas, que foi acompanhada pela leitura espectrofotométrica a 280nm. Os inibidores retidos foram eluídos com tampão fosfato de potássio dibásico 50mM, NaCl 0,5M, pH 11,5.

Com o fim de se determinar a capacidade máxima de ligação de inibidores à Sepharose CM-papaína, diferentes volumes de Extratos III de sementes quiescentes (10, 15, 25 e 50 ml) foram submetidos a esse procedimento.

### **3.1.5 - Cromatografia de Afinidade em Sepharose CM-Papaína**

Um volume fixo de 1ml dos vários Extratos I, referentes aos cotilédones de sementes em diferentes estágios de desenvolvimento, foi adicionado a 4ml do gel de afinidade previamente equilibrado em tampão fosfato 0,1M, NaCl 0,5M, pH 7,0. A cromatografia de afinidade foi feita como descrito no item imediatamente anterior. O material não retido foi denominado de Pico I ( $P_I$ ) e os materiais eluídos a pH 11,5 foram referidos como  $P_{II}$ ,  $P_{III}$ ,  $P_{IV}$ , de acordo com o perfil gráfico obtido.

### **3.1.6 - Dosagem da Atividade de Proteinases Cisteínicas**

O substrato cromogênico utilizado para a dosagem de proteinases cisteínicas nos materiais provenientes das cromatografias de afinidade foi o APANA, sintetizado no Depar-

tamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina sob a supervisão do Dr. Luís Juliano Neto (JULIANO & JULIANO, 1985).

A papaína foi ativada segundo metodologia descrita por ZUCKER *et al.* (1985). Volumes variáveis de solução de papaína 190nM (20 a 100 $\mu$ l) foram adicionados a 250 $\mu$ l do tampão de ativação (fosfato de sódio 0,4M, EDTA 4mM, DTT 8mM, pH 6,8). Após um tempo de pré-incubação de 15 min a 40°C o volume foi completado para 990 $\mu$ l com água destilada, previamente aquecida a 40°C. Foram então adicionados 10 $\mu$ l de APANA (100mM), resultando em uma concentração final de 1mM. A hidrólise processou-se por 5 min, a 40°C, quando a reação era então interrompida pela adição de 1ml de ácido acético a 30% (OLIVA, 1988).

Para determinação da atividade de proteinases cisteínicas nos cotilédones em diversos estágios de desenvolvimento, foram usadas alíquotas de 100 $\mu$ l de extratos de cotilédones (Extrato I) e/ou de material referente ao P<sub>I</sub> das cromatografias de afinidade. Os resultados foram expressos em unidades de proteinases cisteínicas (UPC), sendo uma UPC definida como a quantidade de enzima que produz uma absorbância de 0,250 UDO a 280nm, em um volume de reação de 1ml, por 5 min, a 40°C.

### 3.1.7 - Determinação de Atividade Inibitória contra Papaína

Os eluatos P<sub>I</sub>, P<sub>II</sub>, P<sub>III</sub> e P<sub>IV</sub> foram testados quanto à presença e quantidade de inibidores de papaína. Alí-

quotas de 50 $\mu$ l das amostras sob análise foram adicionadas à solução de enzima, imediatamente antes da adição do substrato (APANA), sendo mantido o volume total do ensaio (1ml). As demais condições foram descritas em 3.1.6.

A atividade inibitória foi expressa em unidades de inibidor (UI) utilizando-se a definição formulada por XAVIER-FILHO (1974).

### **3.1.8 - Determinação dos Inibidores de Papaína em Eixos em Desenvolvimento**

Devido ao pequeno tamanho dos eixos e, conseqüentemente, menor quantidade de farinha obtida, optou-se por uma metodologia de maior precisão, para o acompanhamento das alterações dos níveis de inibidores de papaína nestes órgãos.

A metodologia empregada nesta etapa enquadra-se entre os vários ensaios simples e convenientes de filtração em suporte sólido de anticorpos monoclonais, descritos por WOOD (1984), com algumas modificações baseadas em protocolo básico para técnica de "Western Blotting" (WINSTON *et al.*, 1987) e ainda segundo instruções de preparo de soluções para uso em sistemas de ensaios de "imuno-blot" BIO-RAD (Instruções do fabricante).

#### **3.1.8.1 - Preparação de Antisoros contra Inibidores de Papaína**

Os antisoros contra os inibidores de papaína de *V. unguiculata* cv. pitiúba foram preparados pelo Dr. Robert

Thornburg, na Universidade de Iowa - EUA, a partir de uma fração destes inibidores, obtida de extrato de sementes quiescentes, submetido a precipitação salina e cromatografia de afinidade em Sepharose CM-papaína. Esta fração foi fornecida pelo Dr. Francisco de Assis Paiva Campos, pesquisador de nosso laboratório.

### **3.1.8.2 - Purificação dos Anticorpos por Cromatografia de Afinidade em Sepharose CL-4B Proteína-A**

Proteína A, isolada de paredes celulares de Staphylococcus aureus (VERWEY, 1940) possui a habilidade de interagir e formar precipitados com uma grande diversidade de moléculas de imunoglobulinas de diferentes espécies (HJELM et al., 1975).

Uma coluna montada a partir de 0,5g de gel (Sepharose CL-4B proteína A), previamente intumescido em água destilada, foi lavada e equilibrada com tampão fosfato 0,1M, pH 7,0. Uma amostra de 100mg do antisoro rico em IgGs desejadas, dissolvida em 10ml do tampão de equilíbrio, foi aplicada à coluna de afinidade. Esta foi extensivamente lavada com o mesmo tampão até a total liberação dos materiais protéicos não retidos, o que foi deduzido pelas leituras de absorbância (280nm) ao longo dos tubos coletados. Após esta fase, a coluna foi permeada por ácido acético 1M com a consequente eluição dos anticorpos presos à matriz. O material eluído foi submetido à diálise contra solução salina 0,9% por 24h, procedendo-se três trocas da solução durante este tempo. Ao final, a preparação purificada dos anticorpos

adicionou-se mertiolate 1%, visando sua melhor conservação em "freezer".

### **3.1.8.3 - Técnica de "Dot Blot" para Avaliação dos Inibidores de Papaína em Eixos e Cotilédones em Desenvolvimento**

Os procedimentos envolvidos nos ensaios de filtração de anticorpos em fase sólida requerem suprimentos adequados de antígenos a serem adsorvidos, através de ligações não covalentes, a placas de PVC ou membranas de nitrocelulose. Estas últimas apresentam vantagens como suportes sólidos já que requerem quantidades muito menores de antígenos e permitem uma discriminação mais acentuada entre ligações reais e "background" (WOOD, 1984). Adotou-se, portanto, procedimentos compatíveis com este suporte e o conjunto destes, abaixo enunciados, passou a ser referido como "dot blot".

I - Uma folha de nitrocelulose de aproximadamente 7 x 3,5cm, dividida em quadrados iguais de aproximadamente  $1\text{cm}^2$ , foi umedecida com tampão fosfato 0,1M, NaCl 0,5M, pH 8,0;

II - Alíquotas de 15 $\mu$ l (7,5 $\mu$ l de cada vez) dos vários Extratos I e II, obtidos de cotilédones e eixos, respectivamente, foram aplicadas separadamente em cada um dos quadrados marcados na membrana de nitrocelulose, esperando-se as gotas secarem completamente;

III - A membrana foi mergulhada em 15ml de tampão

bloqueador (1g de caseína em 100ml de tampão fosfato 0,1M, NaCl 0,5M, pH 8,0) e mantida nesta solução por 1h, visando bloquear sítios não-específicos na membrana;

IV - Uma alíquota de 0,23ml da solução de anticorpos contra inibidores de papaína de feijão-de-corda pitiúba (CPI), anteriormente purificados, foi diluída em 15ml de tampão bloqueador e esta solução foi vertida sobre a membrana e deixada ali por 1h;

V - A membrana foi então lavada quatro vezes com 20ml do mesmo tampão fosfato já mencionado, de 15 em 15 minutos;

VI - Uma alíquota de 27 $\mu$ l do conjugado HRP-anti-IgG foi diluída em 15ml de tampão bloqueador e a membrana foi mergulhada nesta solução por 1h;

VII - A operação do item V foi repetida;

VIII - Procedeu-se a preparação do substrato, segundo instruções BIO-RAD (Instruções do fabricante), como se segue:

a) 6mg de reagente para desenvolvimento de cor de HRP foram dissolvidos em 2ml de metanol, sob proteção da luz e imediatamente antes do uso;

b) Adicionaram-se 6 $\mu$ l de água oxigenada a 30% (4°C), a 10ml de tampão TRIS-HCl 20mM, NaCl 0,5M, pH 7,5, também imediatamente antes do uso.

Os reagentes a e b, acima, foram reunidos e postos

sobre a membrana de nitrocelulose. A coloração se desenvolveu entre 2 e 3min. Para que a coloração fosse mais acentuada, a membrana foi mantida na solução do substrato por 15 horas, em ausência de luz.

Foram feitas provas em branco para as concentrações extremas de inibidor, onde a amostra com zero de inibidor foi representada por tampão fosfato 0,1M, NaCl 0,5M, pH 8,0 e a de maior concentração por uma fração previamente enriquecida de inibidores de papaína de feijão-de-corda pitiúba. Esta fração foi obtida a partir de várias cromatografias de afinidade em Sepharose CM-papaína de extratos 1:10 (p/v) de farinha de sementes quiescentes de feijão-de-corda pitiúba. As frações com atividade inibitória provenientes destas cromatografias, após liofilização, foram dissolvidas em tampão fosfato 0,1M, NaCl 0,5M, pH 7,6, passando a ser referidas como solução de inibidor de papaína de feijão-de-corda pitiúba (CPI). Utilizou-se ainda como solução-padrão de efeito comparativo cistatina de clara de ovo de galinha.

### **3.2 - Análise Comparativa dos Níveis de Inibidores de Papaína e Tripsina em Sementes de Diferentes Espécies**

#### **3.2.1 - Preparação dos Extratos**

Sementes quiescentes das 23 espécies vegetais, citadas em 2.3, foram reduzidas a farinha como descrito em 3.1.4. As farinhas resultantes foram extraídas em tampão TRIS-HCl 0,05M, pH 8,0 numa relação de 1:5 (p/v) por 10

min, sob contínua agitação. Após centrifugação a 35.100g por 5 min, obtiveram-se sobrenadantes referidos desta vez como Extratos IV. Estes foram posteriormente utilizados na quantificação dos inibidores de papaína, nas diversas sementes, por ensaio de atividade proteolítica (sistema papaína-caseína).

Já para a determinação dos teores de inibidores de proteinases serínicas do tipo tripsina, por ensaio de atividade enzimática (sistema tripsina-caseína), as farinhas foram extraídas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,6, numa proporção de 1:10 (p/v), durante 10 min sob agitação constante. As soluções foram então centrifugadas a 35.100g por 5 min e os sobrenadantes denominados de Extratos V.

Algumas das sementes já discriminadas, bem como os cultivares CE-11, CE-31, CE-524, IT81D 1045, IT81D 1064 e TVu 2027 de V. unguiculata, foram ainda investigados, no que se refere a presença e teores de inibidores de papaína e tripsina, por "dot blot". Para isto adotou-se a metodologia de extração empregada quando da obtenção dos extratos de eixos em desenvolvimento.

### **3.2.2 - Atividades Proteinásicas e Inibitórias**

#### **3.2.2.1 - Papaína**

A determinação da atividade proteolítica de papaína foi realizada segundo o método de KUNITZ adaptado (ARNON, 1970), utilizando-se caseína como substrato. A volumes crescentes de uma solução de papaína, conveniente-

mente diluída em tampão fosfato 0,1M, pH 8,0, foram adicionados volumes de tampão TRIS-HCl 0,05M, pH 8,0, complementares a 0,8ml, e posteriormente 0,2ml de uma solução ativadora, composta por EDTA 0,02M e cisteína 0,05M, pH 8,0. A solução foi incubada por 10 min, em banho-maria a 37°C, antes da adição de 1ml de caseína 1%, preparada em tampão TRIS-HCl 0,05M, pH 8,0. A reação processou-se por 10 min e foi detida pela adição de 3ml de TCA 5%. Nos tubos relativos a provas em branco para as concentrações extremas de papaína, a adição de TCA deu-se antes da aplicação de caseína. As soluções finais obtidas após centrifugação a 10.000g por 5 min e descarte dos precipitados, foram analisadas por espectrofotometria em 280nm.

### 3.2.2.2 - Tripsina

Para se determinar a atividade proteolítica de tripsina bovina, o método de KUNITZ (1947) foi utilizado, sendo empregado caseína como substrato. A tripsina foi diluída em HCl 0,0025N, até uma concentração de aproximadamente 12µg/ml, a partir de uma solução estoque de 0,4mg/ml no ácido acima referido. A volumes crescentes desta solução foram adicionados 1ml de tampão fosfato 0,1M, pH 7,6 e HCl 0,0025N suficiente para um volume final de 2ml, sendo subsequentemente levados a banho-maria a 37°C por 10 min. Após este período, 1ml de caseína 1%, preparada em tampão fosfato 0,1M, pH 7,6, e previamente mantida a 37°C, foi adicionado e a reação foi processada a 37°C por 30 min. A reação foi parada pela adição de 3ml de TCA 5% e após 30 min em tempe-

ratura ambiente, as suspensões foram centrifugadas a 10.000g por 5 min. Alíquotas de 1ml dos sobrenadantes foram neutralizadas com 0,05ml de hidróxido de sódio 2N e o método de FOLIN modificado por LOWRY et al. (1951) foi escolhido para se avaliar os produtos de hidrólise enzimática nos sobrenadantes. As medidas de densidade ótica foram realizadas a 750nm.

Provas em branco foram feitas para as concentrações extremas de tripsina, nas quais a adição de caseína foi precedida pelo uso de TCA.

#### **3.2.2.3 - Inibidores de Papaína**

As atividades inibitórias das frações sob análise foram determinadas através de comparação da atividade enzimática de soluções de papaína contendo quantidades crescentes de inibidores com a atividade de uma amostra de enzima livre de inibidor, segundo o método já mencionado de KUNITZ modificado (ARNON, 1970). Também aqui foram utilizadas provas em branco para as concentrações extremas de inibidor e enzima. A atividade anti-papainásica foi expressa em unidades de inibidor (UI) utilizando-se a definição dada por XAVIER-FILHO (1974).

#### **3.2.2.4 - Inibidores de Tripsina**

A atividade inibitória contra tripsina das diferentes preparações foi estimada por comparação de amostras contendo quantidades crescentes de inibidor em presença de uma quantidade constante de enzima, com amostras contendo

somente enzima, nas mesmas condições de ensaio. Foram feitas provas em branco da enzima, bem como do inibidor, em concentrações extremas. As atividades anti-trípticas das diversas amostras foram expressas em unidades de inibidor (UI) como definido por XAVIER-FILHO (1974).

### 3.2.3 - Análise dos Inibidores de Papaína e Tripsina por "Dot Blot"

#### 3.2.3.1 - Precipitação por Sulfato de Amônio

Os extratos das sementes de O. sativa, T. sativum, E. contortisiliquum, G. hispida, T. baccata, P. maritima e cultivares de V. unguiculata foram precipitados com sulfato de amônio a 80% de saturação com posterior centrifugação a 20.800g por 20 min. Os precipitados obtidos foram então ressuspensos em tampão fosfato 0,1M, NaCl 0,5M, pH 7,6 e as soluções resultantes foram submetidas à diálise por 24h, a 8°C.

#### 3.2.3.2 - Preparação de Antisoros

Os antisoros contra os inibidores de papaína de V. unguiculata cv. pitiúba, utilizados nesta etapa, foram os mesmos referidos no item 3.1.8.1, onde foi mencionada sua preparação. Já os antisoros contra os inibidores de tripsina de V. unguiculata cv. seridô foram preparados por Sidney Torres Vieira, estudante do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

### 3.2.3.3 - Purificação de Anticorpos contra Inibidores de Tripsina

A metodologia de cromatografia de afinidade em Sepharose proteína A citada em 3.1.8.2 foi novamente empregada nesta fase.

### 3.2.3.4 - "Dot Blot" para Avaliação dos Inibidores de Papaína e Tripsina nas Sementes

As soluções obtidas em 3.2.3.1, a partir de sementes de O. sativa, T. sativum, E. contortisiliquum, G. hispida, T. baccata, P. maritima e dos cultivares de V. unguiculata, foram submetidas a metodologia de "dot blot" para avaliação dos inibidores de papaína. Para isso os procedimentos descritos em 3.1.8.3 foram adotados. Os inibidores de tripsina foram também avaliados nos seis cultivares de V. unguiculata e neste caso, uma alíquota de 0,3ml da solução de anticorpos contra tripsina foi utilizada na fase IV do protocolo descrito no item 3.1.8.3.

Como soluções-contrôle para esses experimentos foram empregadas as de albumina sérica bovina (BSA), de inibidor de tripsina de soja (SBTI), de inibidor de tripsina de feijão-de-corda pitiúba (BTCl), de vicilina de feijão-de-corda pitiúba (VIC), de inibidor de papaína de feijão-de-corda pitiúba (CPI) e de cistatina de ovo de galinha (CIS).

### 3.3 - Purificação Parcial dos Inibidores de Papaína em Sementes Quiescentes de Feijão-de-corda Pitiúba

#### 3.3.1 - Purificação dos Inibidores

As etapas de purificação parcial dos inibidores de papaína, presentes em sementes quiescentes de feijão-de-corda pitiúba, estão apresentadas na **FIGURA 1**.

Sementes com tegumento foram usadas para preparação da farinha, como descrito em 3.1.4. A farinha obtida (1kg) foi extraída, numa proporção de 1:5 (p/v), em tampão acetato de sódio 10mM, NaCl 0,01M, pH 5,7, com adição posterior de HCl 600mM numa relação de 1:5 (v/v), sendo o pH final 3,5. A extração foi feita sob agitação constante, por 30 min. A suspensão foi então filtrada em tecido de nylon e o filtrado ajustado a pH 6,0 com carbonato de sódio 2M. Em seguida, a solução foi centrifugada a 13.300g por 20 min e ao sobrenadante obtido chamou-se Extrato VI.

O Extrato VI foi precipitado com sulfato de amônio a 70% de saturação, por 15h, a temperatura de 8°C. A suspensão foi centrifugada a 13.300g por 20 min e o sobrenadante (S<sub>1</sub>) foi descartado. Ressuspendeu-se o precipitado (P<sub>1</sub>) em tampão fosfato 0,05M, pH 7,5 e esta solução foi então novamente precipitada com sulfato de amônio a 30% de saturação. Após centrifugação a 13.300g por 20 min, desprezou-se o precipitado (P<sub>2</sub>) e o sobrenadante (S<sub>2</sub>) mais uma vez foi precipitado com o sal, dessa vez a um intervalo de 30-90. Centrifugada a preparação por 20 min a 13.300g, o sobrenadante (S<sub>3</sub>) foi descartado e o precipitado (P<sub>3</sub>) foi



redissolvido em tampão fosfato 0,05M, pH 7,5 e dialisado contra tampão fosfato 0,005M, pH 6,0. Após diálise e posterior centrifugação nas mesmas condições descritas neste item, o sobrenadante ( $S_4$ ) foi armazenado em congelador para uso subsequente.

CM-celulose foi utilizada na purificação dos inibidores a partir do sobrenadante  $S_4$ . Após suspensão em água, 50g de CM-celulose foram sucessivamente lavados com HCl 0,1N, água destilada, NaOH 0,1N, água destilada e tampão fosfato 5mM, pH 6,0 (tampão de equilíbrio da coluna). O sobrenadante  $S_4$  foi então adicionado à CM-celulose e deixados em agitação por 30 min. Após este período o gel foi filtrado a vácuo, em funil de Büchner, com um volume de tampão de equilíbrio suficiente para a liberação dos materiais não adsorvidos, identificada pelas leituras de absorbância em 280nm. O eluato resultante dessa filtração foi denominado de fração  $F_{I}^{CM}$  e armazenado em "freezer" a  $-4^{\circ}C$ . O material retido na CM-celulose foi eluído com tampão fosfato 100mM, pH 7,5 e denominado fração  $F_{II}^{CM}$ , a qual foi congelada e armazenada para utilização posterior.

Ambas as frações obtidas por troca iônica foram precipitadas com sulfato de amônio a 95% de saturação. Descartados os sobrenadantes, após centrifugação a 13.300g por 20 min das suspensões, os precipitados  $P_1F_I^{CM}$  e  $P_1F_{II}^{CM}$  foram dissolvidos em tampão fosfato 30mM, pH 7,5 e tampão fosfato 0,1M, NaCl 0,5M, pH 7,0, respectivamente. Ambas as soluções foram dialisadas contra os tampões de dissolução

e centrifugadas por 10 min a 13.300g. Os sobrenadantes obtidos foram chamados  $S_2F_{I}CM$  e  $S_2F_{II}CM$ , tendo sido o primeiro deles liofilizado e armazenado em  $-4^{\circ}C$ .

Toda a metodologia acima foi baseada em RELE et al. (1980), na purificação de inibidores de V. unguiculata subsp. cylindrica.

O sobrenadante  $S_2F_{II}CM$  foi aplicado a uma coluna de 1,5 x 39,0cm de Sepharose CM-papaína, previamente equilibrada com tampão fosfato 0,1M, NaCl 0,5M, pH 7,0. O fluxo usado foi de 60ml/h e coletadas frações de 3,5ml em um coletor automático de frações. Inicialmente a eluição foi feita com o tampão de equilíbrio da coluna e em seguida, aplicou-se tampão fosfato 50mM, NaCl 0,5M, pH 11,5. De acordo com o perfil gráfico obtido a partir das leituras de absorvância a 280nm, os picos observados foram referidos como as frações da afinidade  $F_{I}Afin$ ,  $F_{II}Afin$ , etc., que, após liofilizadas foram estocadas em "freezer" para análise posterior.

### 3.3.2 - Determinação de Proteínas, Atividades Enzimáticas e Inibitórias

#### 3.3.2.1 - Determinação de Proteínas

O teor de proteína das amostras provenientes das diversas etapas de purificação (FIGURA 1) foi determinado pelo método fotolorimétrico de BRADFORD (1976), utilizando-se BSA como padrão. Nesta metodologia as soluções-problema foram convenientemente diluídas e um volume de 5ml do

reagente de BRADFORD foi adicionado a um volume de 0,1ml de cada uma das amostras. Após 10 min da adição do reagente de BRADFORD, a densidade ótica das diversas soluções foi determinada a 595nm em um espectrofotômetro CELM Modelo E-210D. A avaliação de proteínas nos efluentes das várias colunas cromatográficas foi também feita por leituras de absorbância a 280nm, em um espectrofotômetro VARIAN de duplo feixe.

### 3.3.2.2 - Atividade de Papaína

A atividade proteolítica de papaína foi avaliada segundo método de KUNITZ modificado (ARNON, 1970) e já descrito em 3.2.2.1. A titulação de papaína ativa foi feita através dos métodos de KUNITZ adaptado (ARNON, 1970) e aquele descrito por OLIVA (1988) utilizando-se cistatina como titulador. No primeiro caso (sistema papaína-caseína), 100µl de papaína (aproximadamente 44µM) foram acrescidos de volumes variáveis (10 a 160µl) de cistatina 8mM e então obedecidas as condições restantes do ensaio, descritas em 3.2.2.1. No segundo caso (sistema papaína-APANA), 100µl de papaína (aproximadamente 130nM), após ativados e diluídos conforme descrito em 3.1.6, foram também acrescidos de diferentes volumes (10 a 50µl) de cistatina 0,4µM, seguindo-se então o restante do protocolo referido em 3.1.6.

### 3.3.2.3 - Atividade de Proteinases Cisteínicas Endógenas

A determinação dos níveis de proteinases cisteínicas do tipo papaína nas sementes quiescentes de feijão-de-

corda pitiúba foi feita utilizando-se APANA como substrato e, como fonte de enzima, Extrato III de sementes quiescentes (desta vez obtido em uma relação de 1:5 (p/v)) e mantido em banho de gelo.

Os níveis de proteinases cisteínicas ativas foram medidos utilizando-se cistatina como titulador e foi seguido o procedimento descrito por ZUCKER *et al.* (1985). A uma alíquota de 100 $\mu$ l do Extrato III, após ativação, foram adicionados volumes variáveis (10 a 50 $\mu$ l) do inibidor específico de proteinases cisteínicas (cistatina 0,2 $\mu$ M), em um volume final de 980 $\mu$ l.

#### 3.3.2.4 - Atividade de Inibidores de Papaína

No decorrer do processo de purificação parcial (**FIGURA 1**) as frações obtidas nos diversos estágios foram analisadas para atividade inibitória contra proteinases cisteínicas do tipo papaína. Neste caso utilizou-se o método de ARNON (1970), descrito em 3.2.2.3, empregando-se caseína como substrato.

Ressalte-se que alguns desses materiais foram submetidos a essas determinações antes e após aquecimento a 80°C por 10 min, quais sejam, as frações F<sub>II</sub> e F<sub>III</sub> da cromatografia de afinidade em Sepharose CM-papaína.

## 4 - RESULTADOS

### 4.1 - Desenvolvimento do Fruto

O acompanhamento das alterações de peso fresco das partes componentes do fruto de Vigna unguiculata cv. pitiúba durante a fase de desenvolvimento está mostrado pelos dados numéricos da **TABELA 2** e representado graficamente nas **FIGURAS 2 e 4A**. Observa-se que as sementes íntegras apresentam ganho de peso fresco até o 16º DAP, quando atingem um valor de 228,8mg/órgão; este peso é reduzido drasticamente em 52% no 17º DAP. De modo diferente, o período de aumento de peso fresco dos pericarpos estendeu-se somente até o 12º DAP, alcançando um valor máximo de 4.912mg/órgão. A partir daí a redução até o 17º DAP culminou com uma perda de 80,6% de peso nos pericarpos. Após a separação dos componentes da semente, as alterações de peso fresco foram também acompanhadas em cotilédones, eixos e tegumentos. Observou-se que os cotilédones apresentaram um padrão de variação de peso fresco semelhante ao observado pelas sementes íntegras, alcançando o maior valor, 188,8mg/órgão, no 16º DAP e perdendo cerca de 64% desse total até o 17º DAP. Com perfil gráfico também aproximado, o aumento de peso fresco de eixos deu-se até o 16º DAP, onde foi atingido um valor de 4,1mg/órgão. Houve então um declínio para 73% desse valor no 17º DAP. Somente os tegumentos não se comporta-

**TABELA 2** - Peso fresco do fruto de *Vigna unguiculata* cv. pitiúba durante o desenvolvimento. Os valores representam a média  $\pm$  o desvio padrão.

DAP	Peso fresco (mg)					
	FRUTO	PERICARPO	SEMENTE	COTIL.	EIXO	TEGUMENTO
4	148,76 $\pm$ 23,5	148,5 $\pm$ 23,4	0,26 $\pm$ 0,1	-	-	-
6	625,59 $\pm$ 84,9	622,6 $\pm$ 84,0	2,99 $\pm$ 0,9	-	-	-
8	2037,76 $\pm$ 421,5	2025,4 $\pm$ 420,0	12,36 $\pm$ 1,5	4,6 $\pm$ 0,5	0,06 $\pm$ 0,003	7,7 $\pm$ 1,0
10	3533,14 $\pm$ 294,0	3483,0 $\pm$ 279,0	50,34 $\pm$ 15,0	29,5 $\pm$ 9,0	0,34 $\pm$ 5,9	20,3 $\pm$ 5,9
12	5070,57 $\pm$ 333,7	4912,0 $\pm$ 316,0	158,57 $\pm$ 17,7	110,0 $\pm$ 9,0	2,87 $\pm$ 0,320	45,7 $\pm$ 8,4
14	2158,40 $\pm$ 392,4	1952,5 $\pm$ 371,0	205,90 $\pm$ 21,4	157,0 $\pm$ 11,1	3,70 $\pm$ 0,0005	45,2 $\pm$ 10,3
16	2067,80 $\pm$ 368,5	1839,0 $\pm$ 344,0	228,80 $\pm$ 24,5	188,0 $\pm$ 21,0	4,10 $\pm$ 0,34	36,7 $\pm$ 3,2
17	1051,30 $\pm$ 93,0	951,3 $\pm$ 86,0	100,00 $\pm$ 7,0	67,0 $\pm$ 4,1	3,00 $\pm$ 0,07	30,0 $\pm$ 2,8

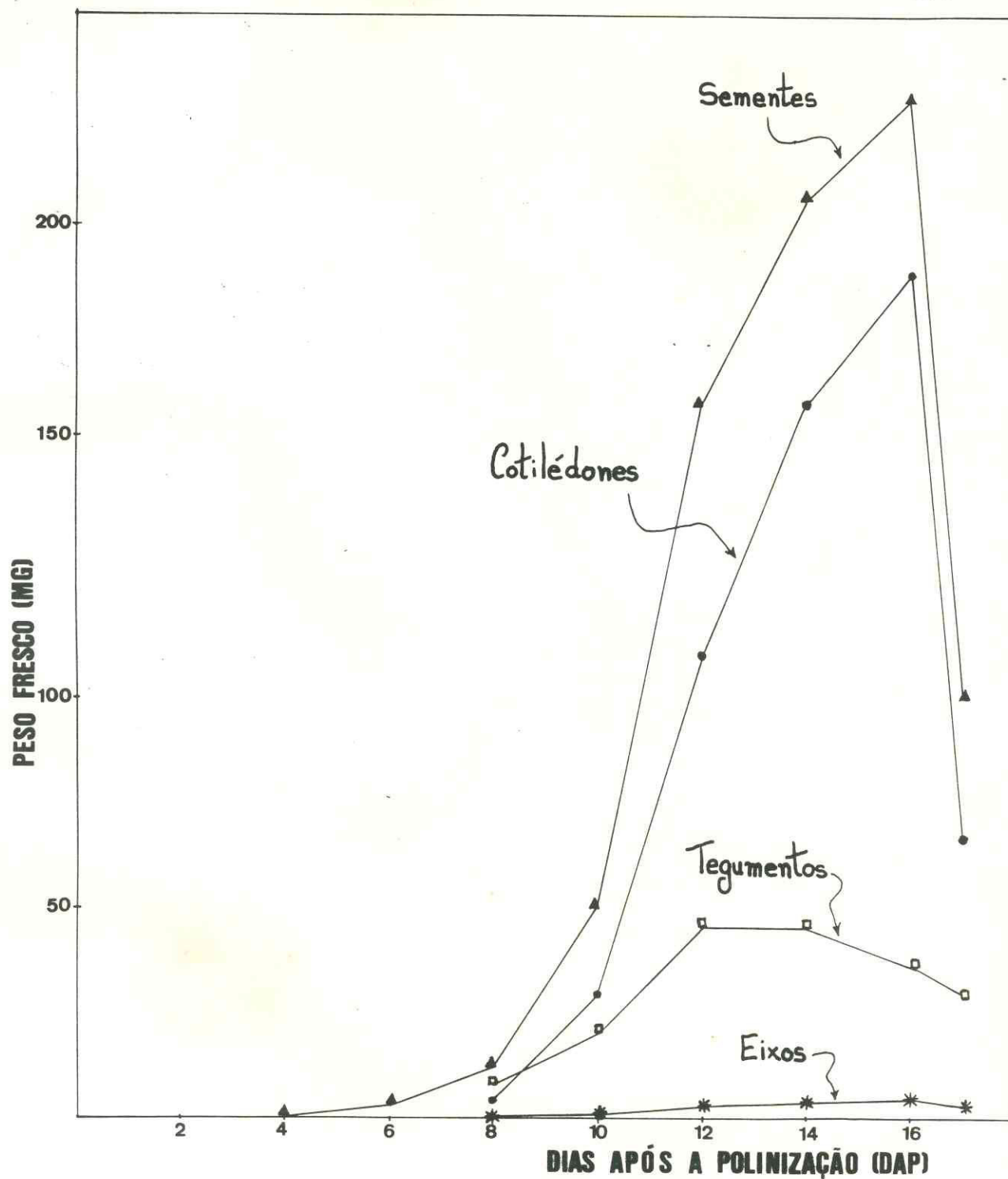


FIGURA 2 - Variação de peso fresco durante o desenvolvimento das sementes de *Vigna unguiculata* cv. pitiúba.

(▲—▲) sementes, (●—●) cotilédones,  
 (□—□) tegumentos, (\*—\*) eixos.

ram de modo parecido aos outros componentes da semente, adquirindo peso fresco até o 12º DAP, semelhante aos pericarpos, com valor máximo de 45,7mg/órgão, e reduzindo gradualmente esse valor em 34% até o 17º DAP. Nesse último caso, percebe-se uma variação total de peso fresco consideravelmente menor que em todos os outros órgãos investigados, cerca de 5 vezes menor que a observada, por exemplo, em cotilédones. A variação de peso fresco do fruto durante o desenvolvimento (**FIGURA 4A**) ocorreu dentro de um padrão idêntico ao observado para pericarpos.

Observe-se aqui que, em virtude de as sementes com mais de 17 dias de desenvolvimento já se mostrarem bastante desidratadas e quebradiças, tornou-se impossível a separação rigorosa de suas partes, sem prejuízo de sua integridade. Por esta razão, as determinações realizadas limitaram-se aos 17 primeiros dias após a polinização sendo a semente, a partir de então, considerada madura.

As **FIGURAS 3 e 4B** mostram as alterações de peso seco das partes do fruto de feijão-de-corda pitiúba durante seu desenvolvimento; os dados numéricos estão resumidos na **TABELA 3**. As sementes, cotilédones, eixos e tegumentos apresentaram um contínuo ganho de peso seco durante todo o processo de desenvolvimento (**FIGURA 3**), o que não é observado em pericarpo (**FIGURA 4B**), onde após o 8º DAP houve uma queda gradual de peso seco, até o alcance de uma relativa estabilidade entre o 13º e 16º DAP. O perfil gráfico relativo à variação de peso seco do fruto foi semelhante àquele

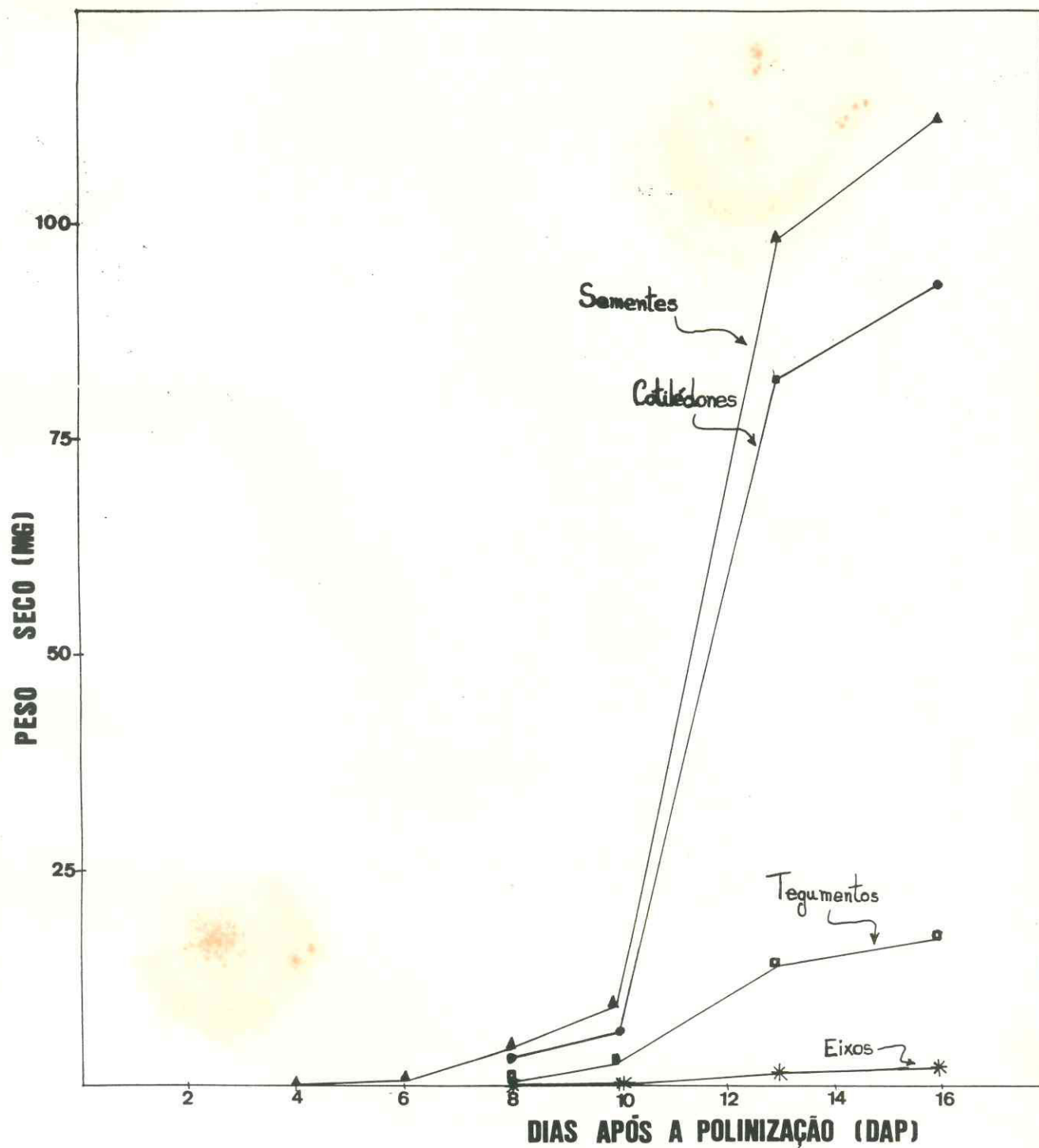
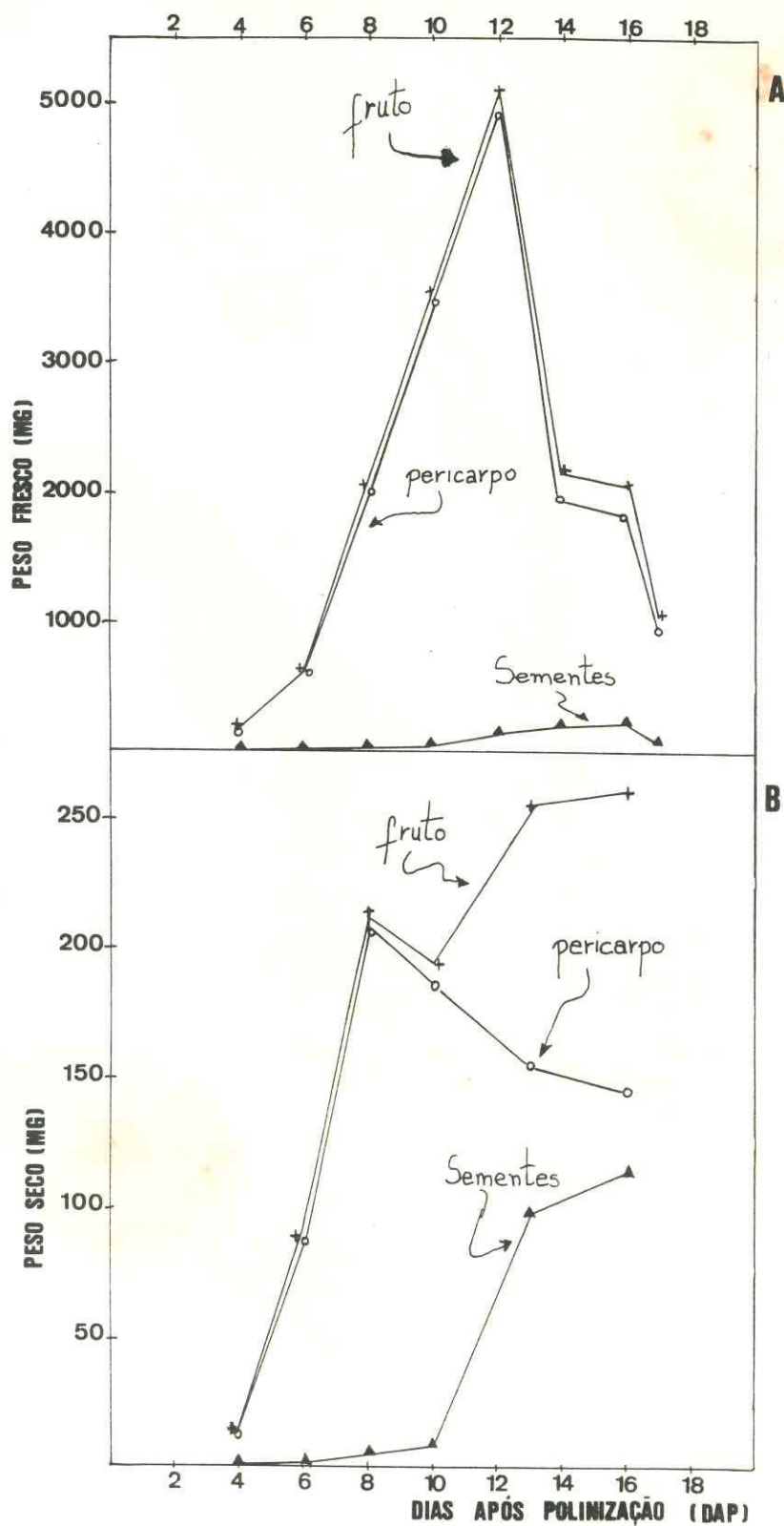


FIGURA 3 - Variação de peso seco durante o desenvolvimento das sementes de *Vigna unguiculata* cv. pitiúba. (▲—▲) sementes, (●—●) cotilédones, (□—□) tegumentos, (\*—\*) eixos.



**FIGURA 4** - Desenvolvimento do fruto de *Vigna unguiculata* cv. pitiúba durante o desenvolvimento. (A) Alterações de peso fresco; (B) Alterações de peso seco.

**TABELA 3** - Peso seco do fruto de *Vigna unguiculata* cv. pitiúba durante o desenvolvimento.

DAP	Peso Seco (mg)					
	Fruto	Pericarpo	Semente	Cotil.	Eixo	Tegumento
4	13,54	13,4	0,14	-	-	-
6	88,69	88,0	0,69	-	-	-
8	212,69	208,3	4,39	3,68	0,04	0,67
10	194,09	184,9	9,19	6,24	0,16	2,79
13	253,17	155,0	98,17	82,06	1,79	14,32
16	259,50	147,3	112,20	93,04	2,10	17,06

delineado por sementes durante o desenvolvimento (**FIGURA 4B**).

#### **4.2 - Expressão de Proteinases Cisteínicas e Inibidores de Papaína durante o Desenvolvimento do Fruto de Vigna unguiculata cv. pitiúba**

##### **4.2.1 - Curva de Saturação de Sepharose CM-Papaína**

Cromatografias de afinidade em Sepharose CM-papaína de diferentes volumes de extrato de sementes quiescentes (Extrato III), como descrito em 3.1.4, foram feitas com a finalidade de se estimar os níveis de saturação do gel. Os materiais retidos nestas cromatografias foram dosados quanto à atividade inibitória contra papaína pelo método descrito em 3.1.7. Os resultados obtidos são mostrados na **FIGURA 5**. Observa-se que a relação ideal entre extrato e gel foi de 20ml para cada 50ml; isto corresponde a uma razão de 10ml de Extrato (1:10)/25ml de gel.

##### **4.2.2 - Cromatografia em Afinidade em Sepharose CM-Papaína**

Os extratos de farinha de cotilédones (Extratos I) de diferentes estágios de desenvolvimento, quando submetidos a cromatografia de afinidade em Sepharose CM-papaína, apresentaram perfis de eluição semelhantes quando analisados, espectrofotometricamente, em 280nm. A **FIGURA 6** mostra o conjunto dos traçados gráficos correspondentes aos extratos de cotilédones com 6, 8, 10, 12, 14 e 16 DAPs. Como se nota, além de  $P_I$  obtido pela eluição inicial com o tampão de equilíbrio, três picos ( $P_{II}$ ,  $P_{III}$  e  $P_{IV}$ ) foram observados após a alcalinização do gel.

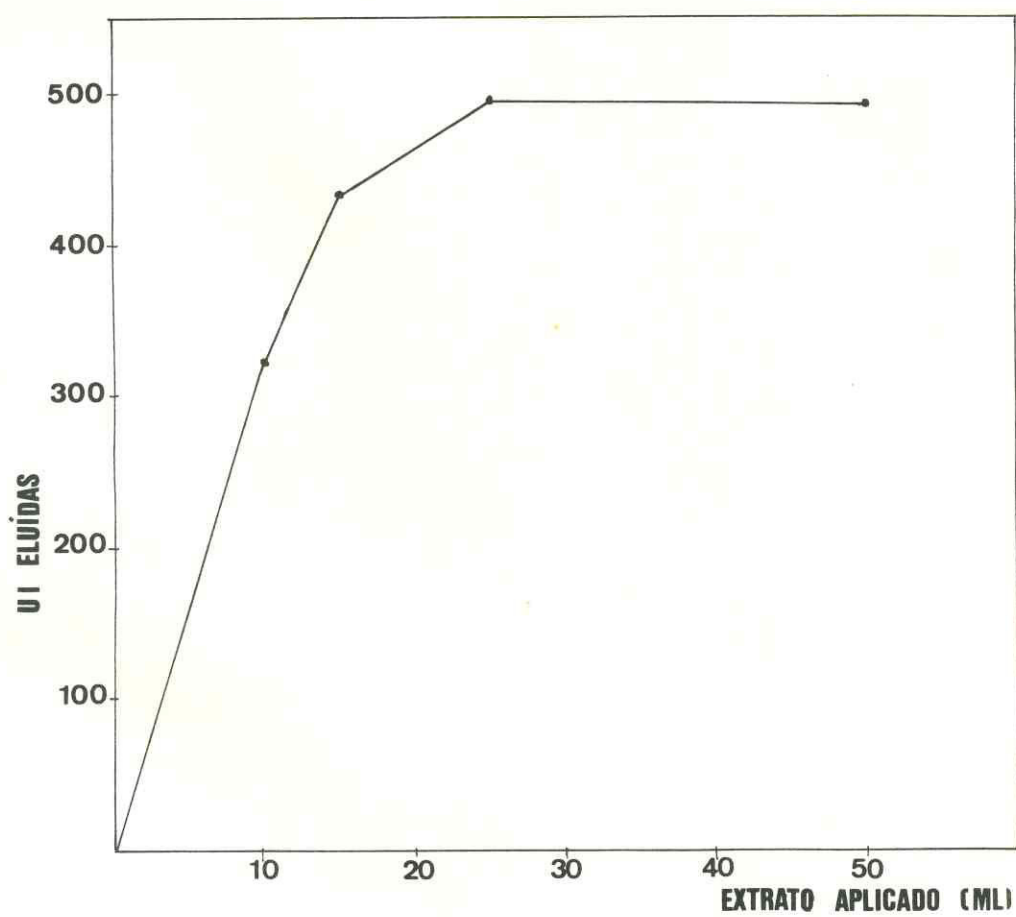
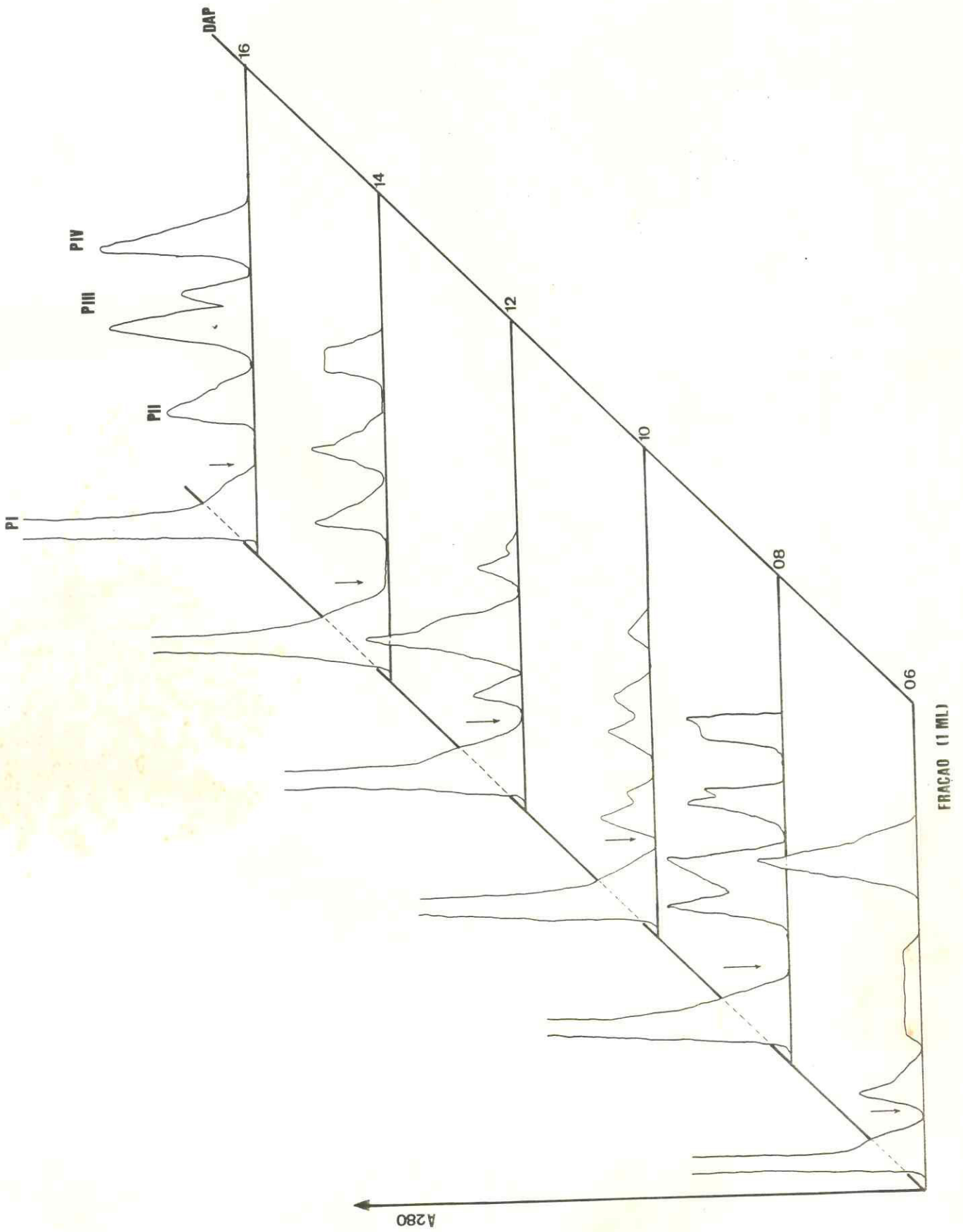


FIGURA 5 - Curva de Saturação de Sepharose CM-papaína.

FIGURA 6 - Cromatografias de Afinidade em Sepharose CM-papaína dos extratos de cotilédones ao longo do desenvolvimento. Coluna 0,25 x 5,1 cm, equilibrada com tampão fosfato 0,1M, NaCl 0,5M, pH 7,0 seguido por tampão fosfato 50mM, NaCl 0,5M, pH 11,5.



#### 4.2.3 - Dosagem da Atividade de Proteinases Cisteínicas

A determinação da atividade de papaína (modelo para proteinases cisteínicas) foi feita pela medida da hidrólise de APANA 1mM, após ativação da enzima a 40°C, usando-se volumes crescentes (20 a 100µl) da solução de enzima 190nM. A velocidade de hidrólise do substrato foi proporcional à concentração de enzima utilizada no ensaio. Uma concentração de 130nM de papaína foi calculada para utilização em determinações posteriores.

Os níveis de atividade de proteinases cisteínicas em Extratos I e nos eluatos P<sub>I</sub> das cromatografias de afinidade são mostrados na TABELA 4 e FIGURA 7. Observa-se que as variações da atividade de cisteíno-proteinases nos Extratos I e nos eluatos P<sub>I</sub> durante o desenvolvimento dos cotilédones apresentam a mesma tendência, exceto no caso do 6º DAP. Em Extratos I a máxima atividade foi detectada no 10º DAP ( $3,01 \times 10^{-3}$  UPC/mg de farinha); nos eluatos P<sub>I</sub> o máximo, no 6º DAP, foi de  $8,6 \times 10^{-3}$  UPC/mg de farinha. Em Extratos I foi visto que no 17º DAP os níveis de proteinases cisteínicas atingiram o valor de 0, enquanto nos eluatos P<sub>I</sub> o valor mínimo de  $0,117 \times 10^{-3}$  UPC/mg de farinha foi atingido no 12º DAP.

#### 4.2.4 - Atividade Inibitória contra Papaína em Cotilédones em Desenvolvimento

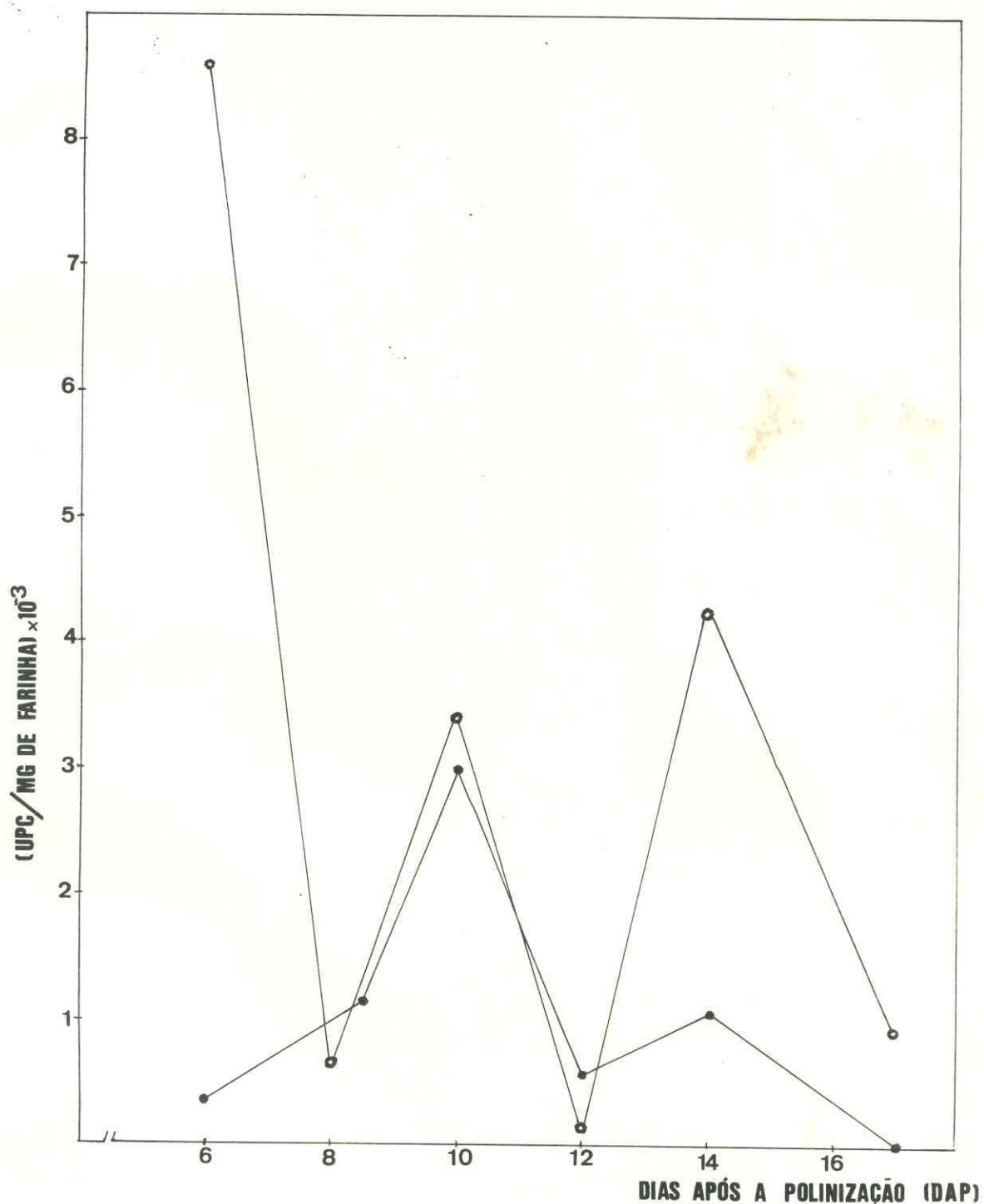
O teor de inibidores de papaína foi medido nos eluatos P<sub>I</sub> (aquecidos a 80°C por 10 min), P<sub>II</sub>, P<sub>III</sub> e P<sub>IV</sub>

**TABELA 4 - Atividade de proteinases cisteínicas em cotilédones de *Vigna unguiculata* cv. pitiúba durante o desenvolvimento.** Os valores representam a média de 2 determinações por cada DAP, exceto no 17º DAP, onde referem-se a média de 3 determinações. Os números entre parêntesis mostram o intervalo de variação encontrado.

DAP	(UPC/mg de farinha) x 10 <sup>-3</sup>	
	Extrato I (a)	Pico I (b)
6	0,35 (0 0,7)	8,6 (8,17 9,02)
8	-	0,64 (0 1,28)
9	1,15 (0 2,31)	-
10	3,01 (1,02 5,0)	3,44 (0 6,09)
12	0,57 (0 1,15)	0,12 (0 0,23)
14	1,06 (0 2,12)	4,25 (3,3 5,2)
17	0,0 (0 0)	0,91 (0 2,37)

(a) Extrato de farinha de cotilédones em desenvolvimento.

(b) Fração da cromatografia de afinidade em Sepharose CM-papaína obtida antes da alcalinização do gel.



**FIGURA 7** - Atividade de proteinases cisteínicas em cotilédones de *Vigna unguiculata* cv. pitiúba em desenvolvimento. (●—●) Extratos cotiledonários (Extrato I); (○—○) Pico I das cromatografias de afinidade (P<sub>I</sub>).

das cromatografias de afinidade. A **TABELA 5** mostra os resultados obtidos e na **FIGURA 8** foi grafado o somatório das atividades inibitórias dos picos  $P_I$ ,  $P_{II}$ ,  $P_{III}$  e  $P_{IV}$  durante o desenvolvimento das sementes, bem como a atividade inibitória detectada nos Extratos I de farinha de cotilédones, após aquecimento a  $80^{\circ}\text{C}$  por 10 min.

Observa-se que as atividades inibitórias determinadas em Extratos I e nos picos provenientes das cromatografias de afinidade variaram dentro de um padrão semelhante, durante o desenvolvimento. O máximo de inibição nos Extratos I foi observado no 8º DAP (0,38 UI/mg de farinha), enquanto nos materiais oriundos das afinidades foi encontrado um valor máximo no 14º DAP (2,26 UI/mg de farinha).

#### **4.2.5 - Avaliação dos Inibidores de Papaína em Cotilédones e Eixos em Desenvolvimento, por "Dot Blot".**

As FIGURAS 9 e 10 mostram os resultados obtidos no acompanhamento dos inibidores em cotilédones e eixos em desenvolvimento, respectivamente.

Na **FIGURA 9** notou-se um leve aumento de atividade inibitória do 4º ao 9º DAP, seguido por uma brusca queda no 10º DAP. Um novo aumento no 11º DAP foi seguido por mais uma diminuição da atividade inibitória em cotilédones de 12 DAPs. Esta atividade voltou a subir no 13º DAP e decresceu ligeiramente no 14º DAP, quando manteve-se relativamente estável até o 17º DAP.

Quanto ao acompanhamento em eixos (**FIGURA 10**), ob-

**TABELA 5** - Atividade inibitória contra papaína em cotilédones de *Vigna unguiculata* cv. pitiúba durante o desenvolvimento. Os valores representam a média de 2 determinações por cada DAP, exceto nos dias 6 e 17 após a polinização, onde referem-se à média de 3 determinações. Os números entre parêntesis mostram o intervalo de variação encontrado.

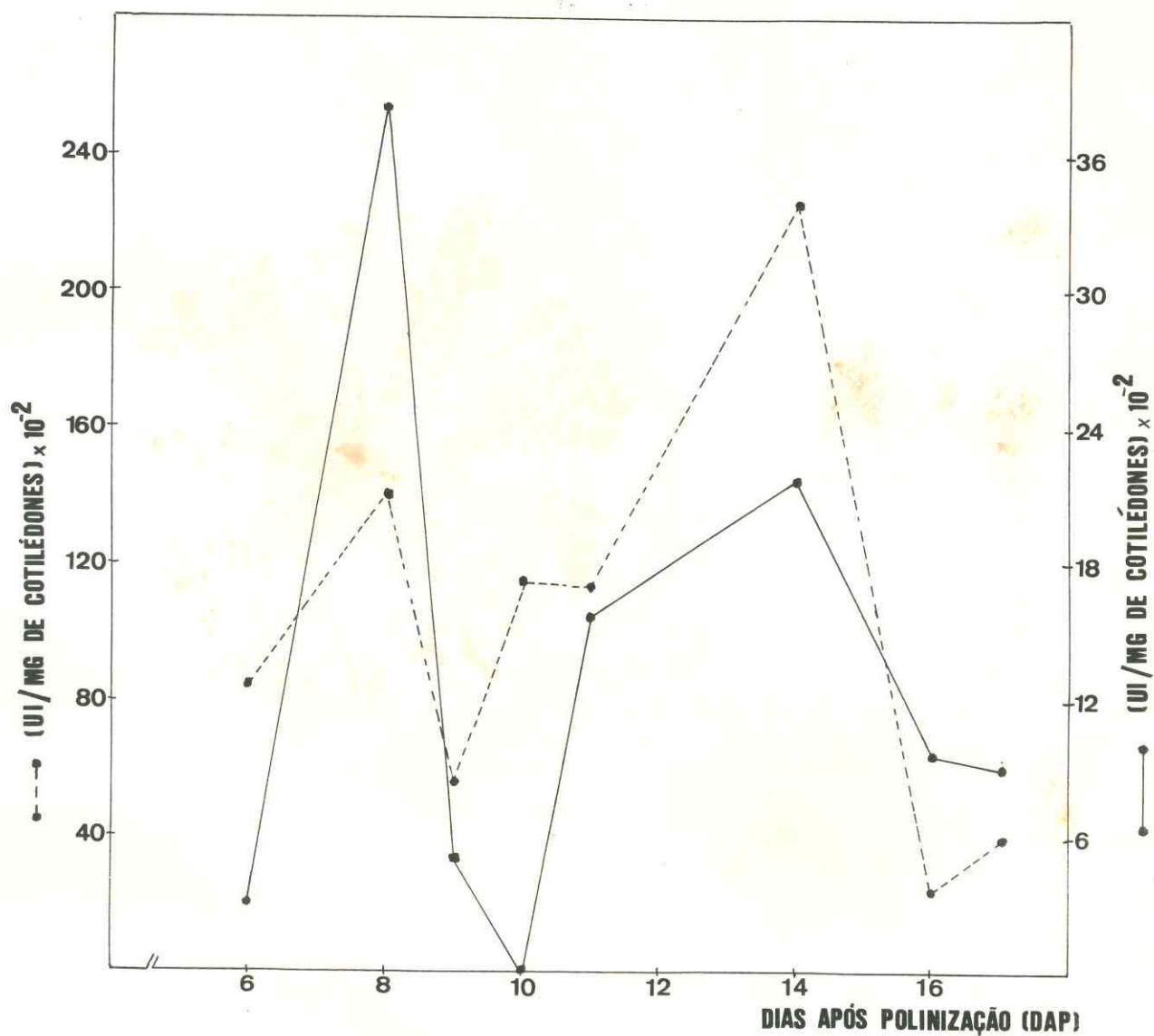
DAP	UI/mg de farinha					
	Extrato I (a)	P <sub>I</sub> (b)	P <sub>II</sub> (c)	P <sub>III</sub> (c)	P <sub>IV</sub> (c)	P <sub>n</sub> (d)
6	0,03(0,00-0,06)	0,29(0,00-0,70)	0,10 (0,06-0,18)	0,17(0,00-0,50)	0,28(0,00-0,80)	0,84(0,10-1,50)
8	0,38(0,01-0,76)	0,48(0,24-0,73)	0,50(0,38-0,62)	0,40(0,23-0,58)	0,02(0,00-0,04)	1,40(1,19-1,62)
9	0,05(0,00-0,10)	0,16(0,15-0,18)	0,12(0,10-0,14)	0,13(0,05-0,21)	0,15(0,13-0,17)	0,56(0,46-0,67)
10	0,00(0,00-0,00)	0,92(0,16-1,69)	0,04(0,00-0,09)	0,16(0,03-0,30)	0,03(0,00-0,07)	1,15(0,60-1,71)
11	0,16(0,12-0,20)	0,13(0,04-0,23)	0,43(0,05-0,81)	0,58(0,44-0,73)	0,00(0,00-0,00)	1,14(0,81-1,48)
14	0,22(0,15-0,29)	0,97(0,35-1,59)	0,32(0,08-0,56)	0,86(0,61-1,11)	0,11(0,00-0,22)	2,26(1,04-3,48)
16	0,10(0,09-0,11)	0,05(0,01-0,10)	0,06(0,01-0,11)	0,03(0,00-0,06)	0,10(0,08-0,12)	0,24(0,10-0,39)
17	0,09(0,06-0,13)	0,11(0,00-0,28)	0,16(0,02-0,42)	0,10(0,01-0,27)	0,03(0,00-0,09)	0,40(0,03-0,96)

(a) Extratos de farinha de cotilédones em desenvolvimento, aquecidos a 80°C por 10 min.

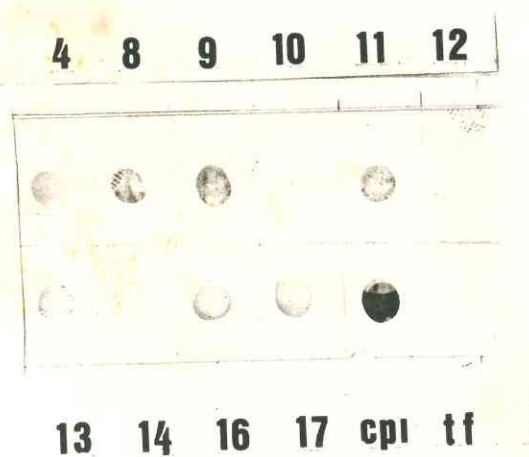
(b) Fração da cromatografia de afinidade em Sepharose CM-papaína, obtida antes da alcalinização do gel, aquecida a 80°C por 10 min.

(c) Frações da mesma cromatografia obtidas após a alcalinização do gel.

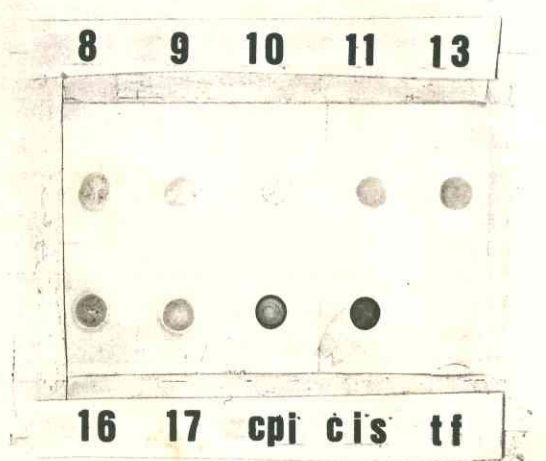
(d) Somatório das frações P<sub>I</sub>, P<sub>II</sub>, P<sub>III</sub> e P<sub>IV</sub>.



**FIGURA 8** - Atividade inibitória contra papaína em cotilédones de *Vigna unguiculata* cv. pitiúba em desenvolvimento. (●—●) Extratos cotiledonários (Extratos I) aquecidos a 80°C por 10 min; (●---●) Somatório das frações das cromatografias de afinidade ( $P_n = P_I + P_{II} + P_{III} + P_{IV}$ ).



**FIGURA 9** - "Dot Blot" de inibidores de papaína em cotilédones com 4,8,9,10,11,12,13,14,16 e 17 DAPs de *Vigna unguiculata* cv. pitiúba. CPI - Inibidor de papaína de feijão-de-corda pitiúba; TF - Tampão fosfato.



**FIGURA 10** - "Dot Blot" de inibidores de papaína em eixos com 8,9,10,11,13,16 e 17 DAPs de Vigna unguiculata cv. pitiúba. CPI - Inibidor de papaína de feijão-de-corda pitiúba; CIS - Cistatina de ovo de galinha; TF - Tampão fosfato.

servou-se um decréscimo mínimo nos níveis de inibidores do 8º ao 10º DAP, com uma pequena mas constante elevação entre os dias 11 e 17 após a polinização.

#### 4.3 - Análise Comparativa entre os Níveis de Inibidores de Papaína e Tripsina em Sementes de Diferentes Espécies

##### 4.3.1 - Análise dos Níveis de Inibidores por Ensaio Enzimático

A quantificação dos inibidores de papaína e tripsina nas sementes citadas em 3.2.1 é mostrada nas **TABELAS 6 e 7**, respectivamente. Pela **TABELA 6** notou-se que o menor valor de atividade inibitória contra papaína encontrado, relativo a sementes de milho, foi de 1,73 UI/g de farinha enquanto o valor máximo foi para sementes de fava-de-vaca, 31,68 UI/g de farinha. A **TABELA 7**, por outro lado, mostra a ausência de atividade em sementes de Taxus baccata em contraste com o valor máximo encontrado de 102.869 UI/g de farinha, para sementes de carolina. A variação total de inibidores de tripsina, portanto, foi da ordem de  $10^5$  UI/g de farinha, enquanto a de inibidores de papaína, apenas de cerca de  $2 \times 10^1$  UI/g de farinha.

##### 4.3.2 - "Dot Blot" para Avaliação de Inibidores de Papaína e Tripsina em Sementes

Os extratos dos seis cultivares de V. unguiculata, sendo três resistentes (IT81D 1045, IT81D 1064 e TVu 2027) e três susceptíveis ao gorgulho Callosobruchus maculatus F. e os obtidos a partir de sementes de O. sativa, T. sa-

**TABELA 6 - Atividade inibitória contra papaína em sementes de plantas de diferentes espécies. Os valores de X representam a média de 1 a 3 determinações de UI/g de farinha.**

SEMENTES	UI/g de farinha			$\bar{X}$
Gymnospermae				
<u>B. orientalis</u>	8,00	-	-	8,00
<u>A. brasiliensis</u>	2,24	5,60	-	3,92
<u>P. maritima</u>	10,20	6,20	-	8,20
<u>P. pungens</u>	11,80	4,58	-	8,19
<u>T. baccata</u>	13,80	-	-	13,80
Angiospermae				
- Monocotyledoneae				
<u>O. sativa</u>	7,17	4,10	4,98	5,42
<u>Z. mays</u>	1,25	2,22	-	1,73
<u>T. sativum</u>	3,84	7,68	5,76	5,76
- Dicotyledoneae				
Leguminosae				
<u>A. pavonina</u>	14,20	10,80	16,80	13,93
<u>E. contortisiliquum</u>	13,72	11,76	5,60	10,36
<u>P. sp.</u>	13,44	24,00	57,60	31,68
<u>T. indica</u>	3,43	3,69	-	3,56
<u>C. gladiata</u>	7,14	12,29	17,87	12,43
<u>P. vulgaris</u>	17,92	26,88	28,16	24,32
<u>V. unguiculata</u>	17,44	17,60	20,16	18,40
<u>D. grandiflora</u>	12,48	10,88	14,08	12,48
Anacardiaceae				
<u>A. occidentale</u>	16,92	22,30	20,16	19,79
Guttiferae				
<u>P. insignis</u>	8,00	12,00	10,00	10,00
Solanaceae				
<u>S. lycopersicum</u>	1,95	1,29	2,20	1,81
Cucurbitaceae				
<u>C. melo</u>	12,96	14,40	5,76	11,04
<u>M. charantia</u>	1,90	-	-	1,90
Compositae				
<u>H. annuus</u>	3,57	-	-	3,57

**TABELA 7** - Atividade inibitória contra tripsina em sementes de plantas de diferentes espécies. Os valores de  $\bar{X}$  representam a média de 1 a 4 determinações de UI/g de farinha.

SEMENTES	UI/g de farinha				$\bar{X}$
Gymnospermae					
<u>A. brasiliensis</u>	12,25	7,0	18,8	23,04	15,27
<u>P. maritima</u>	17,84	-	-	-	17,84
<u>T. baccata</u>	0,00	-	-	-	0,00
Angiospermae					
- Monocotyledoneae					
<u>O. sativa</u>	25,90	25,3	16,0	-	22,40
<u>T. sativum</u>	35,62	34,7	28,0	-	32,77
- Dicotyledoneae					
Leguminosae					
<u>A. pavonina</u>	133376,00	117211,00	71264,00	89624,00	102869,00
<u>E. contortisiliquum</u>	16000,00	15264,00	11232,00	-	14165,00
<u>P. sp.</u>	140,50	143,30	-	-	141,90
<u>T. indica</u>	3,43	3,69	-	-	3,56
<u>C. gladiata</u>	308,00	433,60	554,40	-	432,00
<u>P. vulgaris</u>	2.652,00	3.010,00	2.418,00	2.184,00	2.566,00
<u>V. unguiculata</u>	7.361,00	7.000,00	6.820,00	-	7.060,00
<u>D. grandiflora</u>	2.032,00	2.280,00	2.560,00	3.520,00	2.598,00
Anacardiaceae					
<u>A. occidentale</u>	15,50	16,50	30,40	-	20,80
Guttiferae					
<u>P. insignis</u>	1,60	1,58	2,49	-	1,89
Solanaceae					
<u>S. lycopersicum</u>	12,30	11,40	19,90	-	14,53
Cucurbitaceae					
<u>C. melo</u>	85,50	35,90	-	-	60,70
Compositae					
<u>H. Annuus</u>	67,80	49,20	85,20	-	67,40

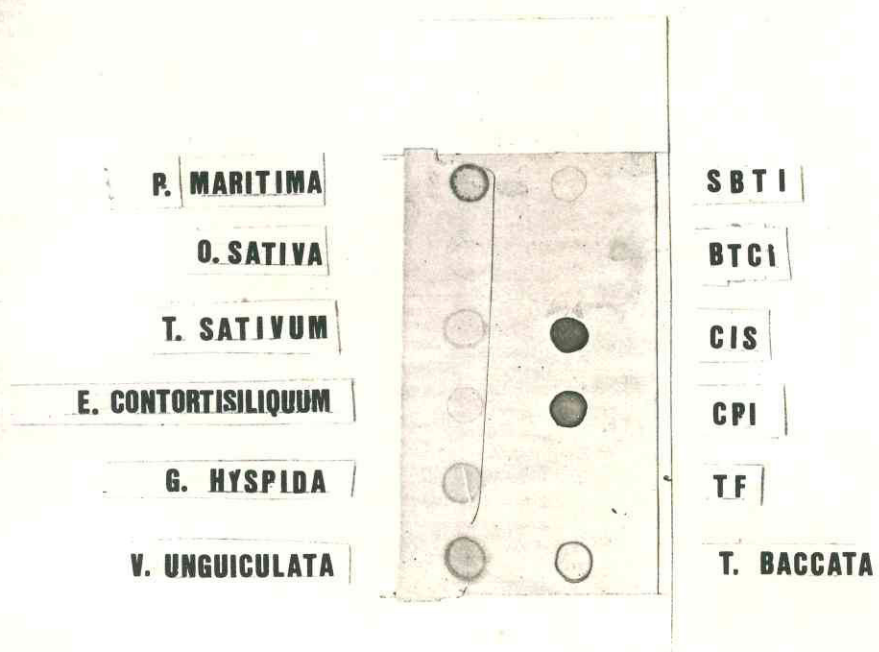
tivum, E. contortisiliquum, G. hispida, T. baccata, P. maritima foram avaliados em seus níveis de inibidores de papaína por "dot blot". Na **FIGURA 11**, as seis sementes acima citadas revelaram-se com níveis semelhantes de inibidores de papaína, bem como as três cultivares resistentes e as três susceptíveis de V. unguiculata ao bruquídeo C. maculatus, conforme é mostrado na **FIGURA 12**.

Os extratos dos cultivares de V. unguiculata também foram avaliados quanto a seus níveis de inibidores de tripsina. Como visto na **FIGURA 13**, não se notou nenhuma variação relevante nos níveis destes inibidores nas sementes. Foi percebida uma reação cruzada entre os anticorpos contra inibidores de tripsina e cistatina, inibidor reconhecidamente específico contra proteinases cisteínicas. Foi também notada uma reação positiva entre estas IgGs e a vicilina da semente.

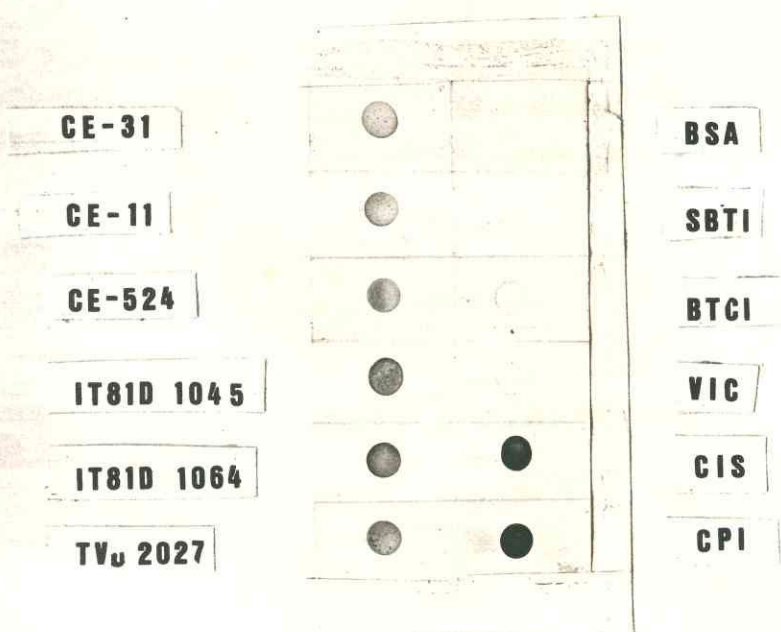
#### **4.4 - Purificação Parcial dos Inibidores de Papaína em Sementes Quiescentes de Feijão-de-corda Pitiúba**

As várias etapas envolvidas na purificação parcial dos inibidores de papaína de sementes de feijão-de-corda pitiúba (**FIGURA 1**), foram sempre acompanhadas por determinações de atividade inibitória (sistema papaína-caseína) e quantificação de proteínas. A **TABELA 8** mostra os dados relativos ao rendimento e purificação alcançados em todo o processo.

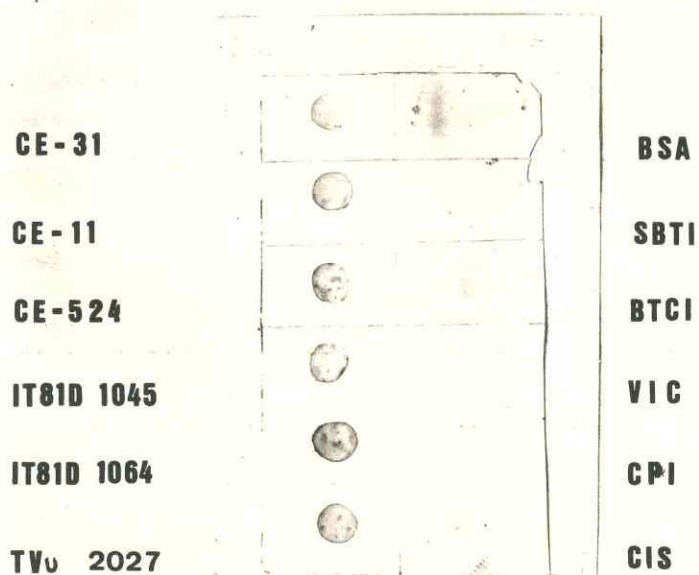
Com relação a esta purificação, a **FIGURA 14** mostra o perfil gráfico da cromatografia de afinidade do material



**FIGURA 11** - "Dot Blot" de inibidores de papaína em seis sementes de plantas de diferentes espécies. SBTI - Inibidor de tripsina de soja; BTCI - Inibidor de tripsina de feijão-de-corda pitiúba; CIS - Cistatina de ovo de galinha; CPI - Inibidor de papaína de feijão-de-corda pitiúba; TF - Tampão fosfato.



**FIGURA 12** - "Dot Blot" de inibidores de papaína em seis cultivares de *Vigna unguiculata*. BSA-Albumina sérica bovina; SBTI - Inibidor de tripsina de soja; BTCI - Inibidor de tripsina de feijão-de-corda pitiúba; CIS - Cistatina de ovo de galinha.



**FIGURA 13** - "Dot Blot" de inibidores de tripsina em seis cultivares de *Vigna unguiculata*. BSA - Albumina sérica bovina; SBTI - Inibidor de tripsina se soja; BTCI - Inibidor de tripsina de feijão-de-corda pitiúba; VIC - Vicilina de feijão-de-corda pitiúba; CPI - Inibidor de papaína de feijão-de-corda pitiúba; CIS - Cistatina de ovo de galinha.

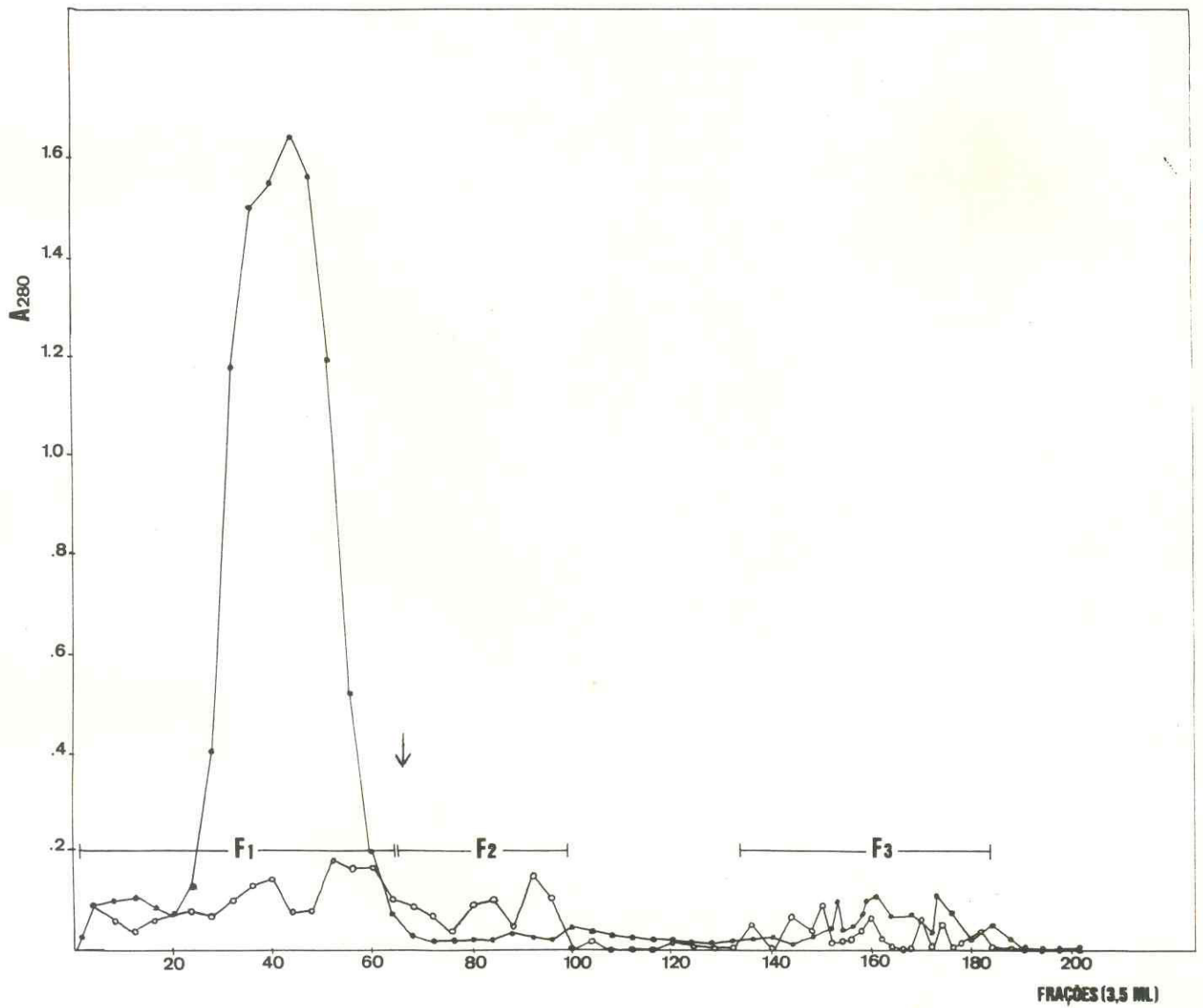
TABELA 8 - Etapas de purificação dos inibidores de papaína em sementes quiescentes de *Vigna unguiculata* cv. pitiúba

FRAÇÃO	Volume (ml)	Atividade Inibitória (a) (UI/ml)	UI Total	Proteína (mg/ml)	Atividade Específica (UI/mg)	Purificação (X)	Rendimento (%)
Extrato VI	2490	5,6	13,944	19,020	0,29	1,0	100,0
P <sub>1</sub> (0-70)	600	2,2	1,320	5,600	0,39	1,3	9,5
P <sub>3</sub> (30-90)	400	3,2	1,280	3,030	1,06	3,6	9,2
S <sub>2</sub> F <sub>I</sub> CM	480	2,6	1,248	3,100	0,84	2,9	8,9
S <sub>2</sub> F <sub>II</sub> CM	120	4,6	552	2,850	1,61	5,5	4,0
F <sub>I</sub> Afin	250	Zero	Zero	0,740	Zero	-	-
F <sub>I</sub> Afin Aq <sup>(b)</sup>	250	Zero	Zero	0,030	Zero	-	-
F <sub>II</sub> Afin	120	3,0	360	0,070	42,90	44,5	2,6
F <sub>II</sub> Afin Aq <sup>(b)</sup>	120	4,6	552	0,002	2300,00	7931,0	4,0
F <sub>III</sub> Afin	175	0,6	105	0,050	12,00	41,4	0,7
F <sub>III</sub> Afin Aq <sup>(b)</sup>	175	0,8	140	0,008	100,00	344,8	1,0

(a) - Atividade inibitória determinada por ensaio enzimático (sistema papaína-caseína)

(b) - Frações aquecidas a 80°C por 10 min.

FIGURA 14 - Cromatografia de afinidade em Sepharose CM-papaína da fração S<sub>2</sub>F<sub>II</sub>CM. Coluna 1,5 x 39,0 cm equilibrada com tampão fosfato 0,1M, NaCl 0,5M, pH 7,0 seguido por tampão fosfato 50mM, NaCl 0,5M, pH 11,5. (●—●) Proteína; (○—○) Atividade inibitória contra papaína (sistema papaína-caseína).

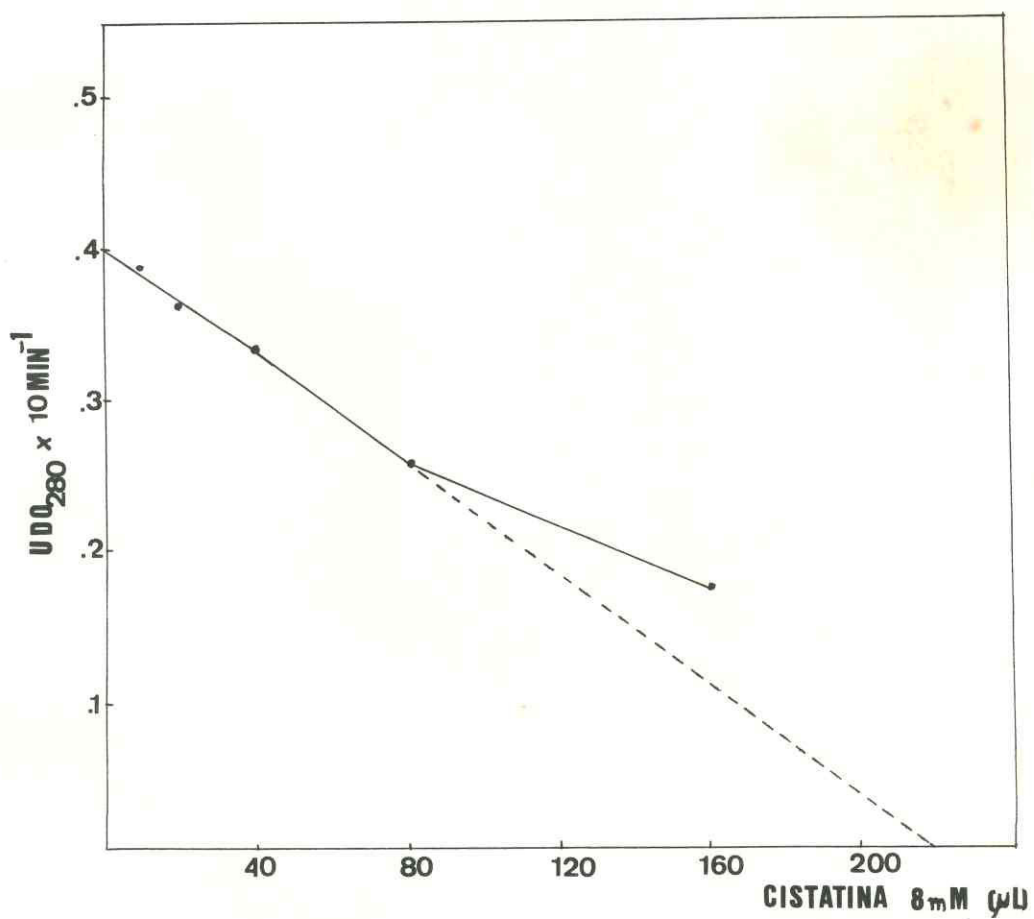


referido como  $S_2F_{II}CM$ . Neste perfil foram visualizadas três frações principais ( $F_I$ Afin,  $F_{II}$ Afin e  $F_{III}$ Afin), posteriormente analisadas, conforme **TABELA 8**. As frações  $F_{II}$ Afin e  $F_{III}$ Afin, antes e após aquecimento a  $80^\circ C$  por 10 min, foram as que mostraram mais alta atividade inibitória. Notou-se também que a atividade inibitória de  $F_{II}$ Afin e  $F_{III}$ Afin aquecidas foi bastante superior a das frações não submetidas ao calor, especialmente em se tratando da  $F_{II}$ Afin.

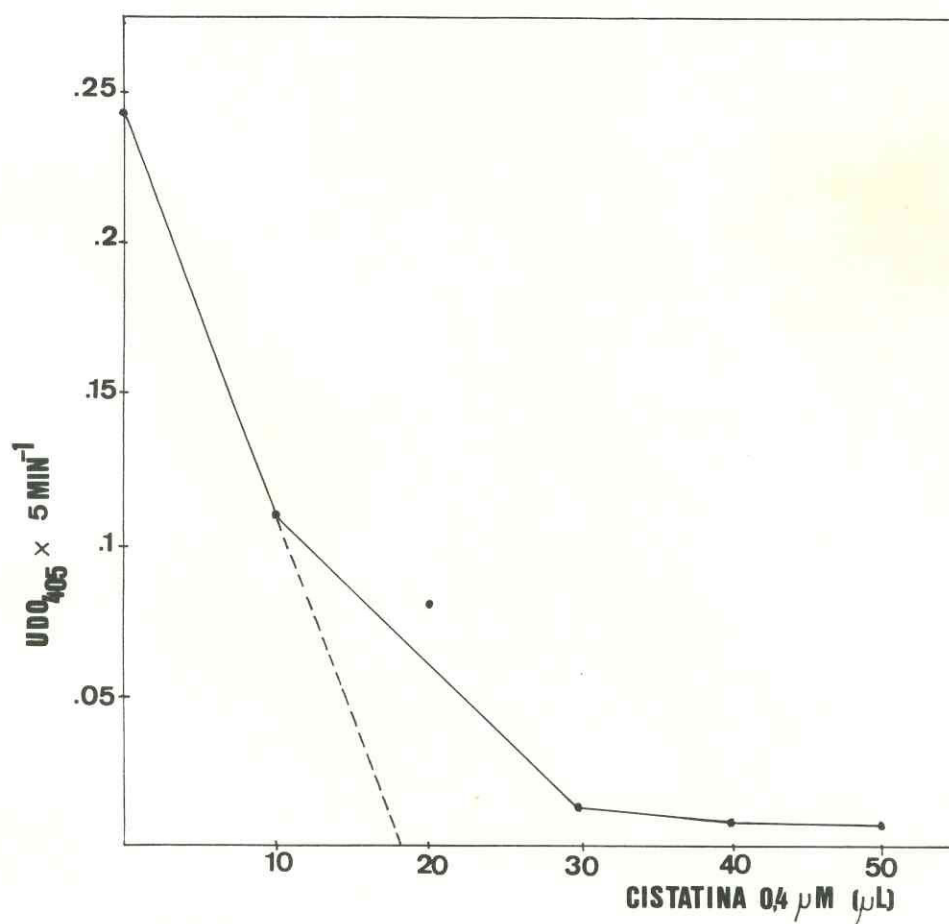
#### 4.4.1 - Titulação de Papaína por Cistatina

A concentração real de enzima ativa utilizada nos ensaios de atividade enzimática e inibitória foi determinada através de sua titulação por cistatina, tanto através do método de Kunitz modificado (ARNON, 1970), como por técnica descrita por OLIVA (1988).

As curvas vistas nas **FIGURAS 15 e 16** representam, respectivamente, a titulação procedida segundo ARNON (1970) e OLIVA (1988). Pela primeira análise encontra-se o valor de  $56,3\mu g$  de papaína, correspondente a uma concentração real de  $24,5\mu M$ . O resultado obtido no segundo caso,  $0,228\mu g$  de papaína, corresponde a uma concentração real de  $99nM$ . Por estes experimentos foi possível determinar-se a relação de equivalência entre massa de inibidor e UI. Esta relação foi de  $20\mu g$  de inibidor para cada UI detectada pelo ensaio caseinolístico, e  $0,13\mu g$  de inibidor para cada UI obtida pelo ensaio colorimétrico utilizando-se APANA como substrato, segundo UI definidas por XAVIER-FILHO (1974).



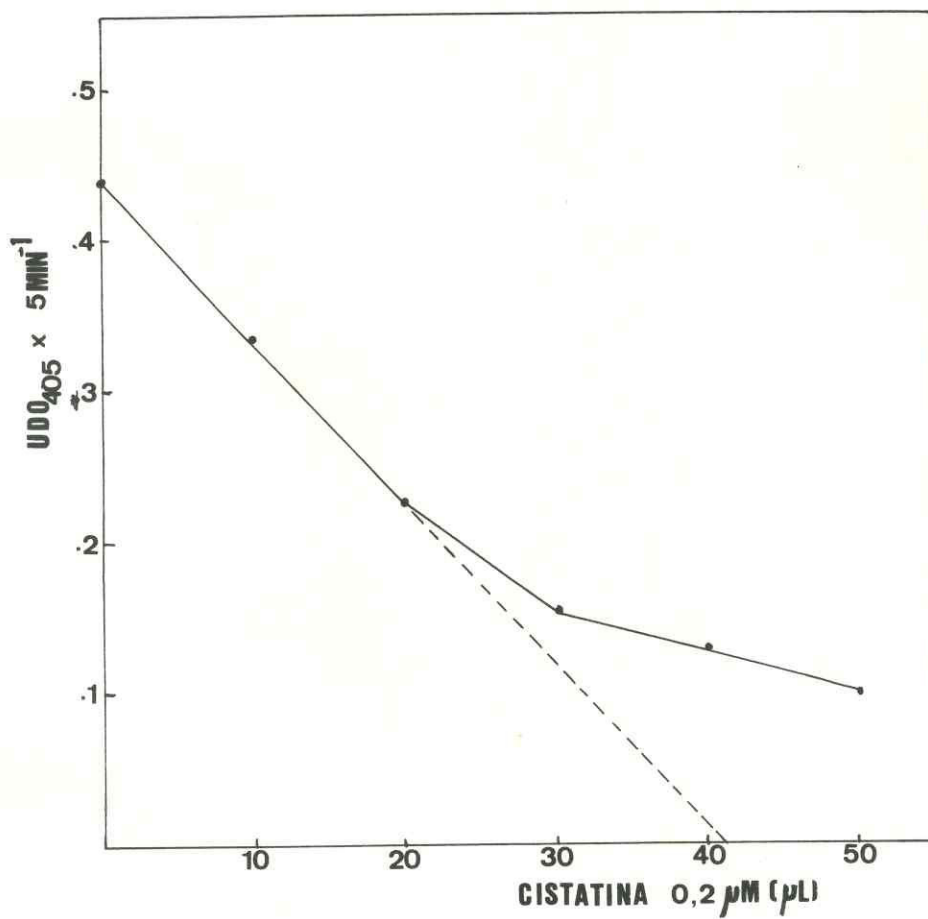
**FIGURA 15** - Curva de titulação de papaína, por cistatina, utilizando caseína como substrato.



**FIGURA 16** - Curva de titulação de papaína, por cistatina, utilizando APANA como substrato.

#### 4.4.2 - Titulação de Proteinases Cisteínicas em Sementes Quiescentes de Vigna unguiculata cv. pitiúba

A curva obtida na titulação de proteinases cisteínicas por cistatina é mostrada na FIGURA 17. Admitindo-se uma relação estequiométrica equimolar da ligação entre as proteinases cisteínicas e a cistatina, estimou-se uma concentração de 2,3 pmoles de proteinases cisteínicas por mg de farinha e uma massa de 0,052 $\mu$ g/mg de peso seco ( $5,2 \times 10^{-3}$ % do peso da semente).



**FIGURA 17** - Curva de titulação de proteinases cisteínicas de sementes quiescentes de Vigna unguiculata cv. pitiúba, por cistatina, utilizando APANA como substrato.

## 5 - DISCUSSÃO

As alterações de peso fresco e peso seco observadas durante o desenvolvimento das sementes de Vigna unguiculata (L) Walp. cv. pitiúba foram similares às de outras sementes já estudadas. Este processo caracteriza-se por um estágio de elevação de peso seco (acompanhado por um intenso aumento de umidade) posteriormente seguido de pronunciada perda de água (MÜNTZ et al., 1978; PUSZTAI et al., 1983).

A duração de cada uma destas etapas variou ligeiramente nos diferentes órgãos componentes da semente. Em cotilédones e eixos a etapa inicial estendeu-se até o 16º DAP enquanto em tegumentos foi concluída no 12º DAP. Este último órgão (**FIGURA 2**) teve comportamento semelhante ao de pericarpos e frutos (**FIGURA 4A**), cuja etapa inicial de ganho de peso fresco foi também completada em 12 DAPs. Já na etapa de desidratação somente os pericarpos não se comportaram de forma idêntica às outras partes do fruto (**FIGURA 3 e 4B**). A queda de peso seco a partir do 8º DAP nos pericarpos foi provavelmente devida ao transporte de compostos orgânicos, destes órgãos, para as sementes, fato já relatado em ervilhas por RAAKE apud DURE (1975) e em V. unguiculata por PEOPLES (1985). Os resultados aqui obtidos foram semelhantes àqueles encontrados por CARASCO & XAVIER FILHO (1981).

As cromatografias de afinidade em Sepharose CM-papaína de extratos de cotilédones em desenvolvimento revelaram vários picos de absorbância em 280nm (**FIGURA 6**). Os picos obtidos pela alcalinização do gel, diferiram, nas diversas cromatografias, nas concentrações e posições de eluição. A obtenção de mais de um pico após a eluição dos inibidores, nestas cromatografias de afinidade, sugere a presença de diferentes formas de inibidores de papaína nestas sementes, a exemplo do que foi observado em V. unguiculata subsp. cylindrica (RELE et al., 1980). Estes iso-inibidores poderiam possuir diferentes afinidades pelo gel e sua expressão gênica diferenciada durante o desenvolvimento explicaria, ainda, os diferentes picos obtidos.

As atividades de proteinases cisteínicas determinadas nos extratos cotiledonários (Extrato I) e eluatos  $P_I$  das cromatografias de afinidade (**TABELA 4, FIGURA 7**) mostraram um padrão de comportamento onde, pelo menos duas vezes durante o processo de desenvolvimento, foi observado um acentuado aumento das mesmas sugerindo, provavelmente, um complexo sistema de ação destas enzimas durante esse processo.

Os níveis de inibidores de papaína medidos em extratos cotiledonários e eluatos  $P_I$ , ambos aquecidos a 80°C por 10 min, e nos outros picos das cromatografias de afinidade, fornecem evidências de duas principais fases de síntese e/ou ativação destas proteínas durante o desenvolvimento das sementes de feijão-de-corda pitiúba (**FIGURA 8**). É

interessante notar que ambas as etapas correspondem a períodos de declínio de atividade proteínásica do tipo cisteína (6 - 8 e 10 - 12 DAPs) detectados em  $P_I$  (FIGURA 7). Além desta observação é também digna de nota a correlação entre o mínimo de atividade inibitória com o máximo de atividade proteínásica de extratos de cotilédones de 10 DAPs (FIGURAS 7 e 8). Estes dados reforçam proposições anteriores de um importante papel na regulação da atividade proteolítica endógena para os inibidores de proteinases cisteínicas em sementes (ASHTON, 1976; RYAN & WALKER-SIMMONS, 1981 e MIKOLA, 1983). A expressão coordenada destas proteínas sugere, ainda, a existência de um sistema de regulação a nível gênico de suas atividades desde a floração até o amadurecimento, a exemplo do observado em sementes de arroz por ABE *et al.* (1987).

O acompanhamento, por "dot blot", dos inibidores de papaína em cotilédones (FIGURA 9), também revela um padrão oscilante de alterações durante o desenvolvimento. Comparando-se estes resultados com aqueles determinados por ensaio enzimático (sistema papaína-APANA) (FIGURA 8), nota-se que o 10º DAP apresentou um mínimo de inibidores por ambas as técnicas. Por "dot blot", observou-se um máximo de inibidores nos 8º e 9º DAPs, enquanto que, por ensaio enzimático, este foi visto somente no 8º DAP. Ressalte-se, entretanto, o caráter semi-quantitativo do método de "dot blot" e a possibilidade de detecção de somente uma ou algumas formas iso-inibidoras (no caso de sua presença em feijão-de-corda pitiúba) com maiores níveis de especificidade ao an-

ticorpo. Desta forma, padrões de expressão gênica diferentes destes iso-inibidores, provavelmente provenientes de uma múltipla família de genes, gerariam diferentes padrões de expressão de atividade inibitória por "dot blot".

Os resultados das determinações de atividade inibitória em eixos (**FIGURA 11**) sugerem a presença de inibidores de papaína em níveis baixos, mas ligeiramente crescentes, durante o desenvolvimento das sementes, a exemplo dos inibidores de tripsina de *V. unguiculata* (CARASCO & XAVIER-FILHO, 1981).

Uma interessante reação cruzada foi observada entre as IgGs preparadas contra inibidores de papaína de feijão-de-corda pitiúba e cistatina (**FIGURAS 10, 11 e 12**), sugerindo uma homologia entre cistatinas de origem vegetal e animal, anteriormente observada por ABE *et al.* (1987a). Essa suposição poderia ser confirmada por estudos de seqüenciamento de aminoácidos destes inibidores.

A quantificação dos inibidores de papaína e tripsina em sementes de plantas de diferentes espécies (**TABELAS 6 e 7**) revelou uma variação de cerca de 100.000 vezes nos níveis de inibidores de tripsina enquanto que esta variação foi de somente 20 vezes, no caso dos inibidores de papaína. Estas concentrações relativamente constantes dos inibidores de papaína e sua ocorrência ubíqua em todas as sementes testadas reforçam a suspeita da participação destes inibidores em mecanismos de regulação da atividade proteolítica endógena, nestes órgãos vegetais. Estes re-

sultados estão de acordo com as determinações em um outro grupo de sementes e em culturas de tecidos vegetais em crescimento, feitas por RELE et al. (1980). Estes autores excluíram um papel básico para os inibidores de proteinases serínicas nos processos primordiais de crescimento e diferenciação celulares e sugeriram ainda uma importante função metabólica endógena para os inibidores de proteinases cisteínicas. Não foi observada correlação entre níveis de inibidores de papaína e de tripsina com o grau evolutivo das plantas em estudo (**TABELAS 6 e 7**). Destacou-se a família Leguminosae como aquela onde os maiores níveis dos inibidores de ambas as classes de proteinases foram detectados.

Quando os inibidores de tripsina e papaína de seis cultivares de V. unguiculata foram analisados por "dot blot" (**figuras 12 e 13**) observou-se que não havia diferenças significantes entre sementes resistentes e susceptíveis ao Callosobruchus maculatus. Estes resultados concordam com os de XAVIER-FILHO et al. (1989), que não observaram correlações positivas entre níveis de inibidores de proteinases e a resistência/susceptibilidade dos cultivares.

O fracionamento dos inibidores de papaína de sementes quiescentes de V. unguiculata cv. pitiúba (**TABELA 8**) resultou numa purificação de 7.931 vezes, correspondente a uma atividade específica de 2.300 UI/mg de proteína ( $F_{II}^{Afin^{Aq}}$ ). Entretanto pode-se também notar nesta última etapa um rendimento total de somente 4% da atividade ini-

bitória inicial do Extrato VI. Uma perda brusca desta atividade ocorreu imediatamente após o primeiro fracionamento do extrato por sulfato de amônio e é provável que ela tenha sido devida a intensa ação proteolítica de enzimas contidas no extrato, sobre os inibidores. Um mecanismo alternativo para evitar essa perda de atividade poderia ser o aquecimento do Extrato a 80°C por 10 min, antes do passo seguinte da purificação. Este aquecimento da amostra mostrou-se eficiente, no caso das frações F<sub>II</sub>Afin e F<sub>III</sub>Afin, na liberação de alguma atividade inibitória latente, possivelmente pela destruição de ligações formadas entre inibidores e enzimas da semente. Fato semelhante foi constatado a partir de experimentos com culturas de tecidos vegetais em crescimento (RELE et alii, 1980).

Baseando-se na curva de titulação (FIGURA 15) e na TABELA 5, calculou-se a concentração de 0,4µg de inibidor/mg de farinha ( $4 \times 10^{-2}\%$ ), para inibidores de papaína em sementes.

Outra relação numérica estabelecida (0,052µg de enzima/mg de farinha) proveio da titulação de proteinases endógenas do tipo cisteína em sementes maduras de feijão-de-corda pitiúba (Figura 20). A estas proteinases são atribuídos papéis de maior relevância no processo de mobilização de reservas durante a germinação (SHUTOV & VAINTRAUB, 1987; MITSUHASHI & MINAMIKA, 1989). Por esta razão, estudos fisiológicos destas enzimas têm se concentrado neste período (ABE et al., 1987; VAINTRAUB & ROPOT, 1988;

MITSUHASHI & MINAMIKAWA, 1989). A presença de proteinases cisteínicas em sementes quiescentes de feijão-de-corda pitíuba, aqui constatada, pode sugerir a ativação destas enzimas pela embebição da semente, durante a inversão dos programas metabólicos de desenvolvimento para germinação, como visto por OKUDA et al. (1987) com relação a ativação de L-malato desidrogenase pela embebição de sementes de soja e por YOMO et al. apud BEWLEY & BLACK (1978) com respeito a uma proteinase cisteínica de cotilédones em germinação de Phaseolus vulgaris. Entretanto, síntese enzimática de novo também foi registrada por BAUMGARTNER & CHRISPEELS (1976) e por MITSUHASHI & MINAMIKAWA (1989), para a endopeptidase sulfidrílica de sementes de Vigna radiata e Vigna mungo em germinação, respectivamente, sendo que nestes casos nenhuma atividade de proteinases cisteínicas foi evidenciada em sementes quiescentes.

## 6 - CONCLUSÕES

1 - Durante o processo de desenvolvimento das sementes de Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. pitiúba, a atividade de proteinases cisteínicas, em cotilédones, mostra-se elevada nos dias 6 e 10 após a polinização e baixa em 8 e 12 DAPs.

2 - A atividade inibitória contra papaína nos cotilédones em desenvolvimento é mais elevada em 8 e 14 DAPs enquanto seus valores mínimos correspondem aos dias 6, 10 e 16 após a polinização.

3 - As duas atividades, proteinásica e inibitória, apresentam um padrão coordenado de expressão durante o desenvolvimento dos cotilédones, pelo menos até o 12º DAP.

4 - Os inibidores de papaína em eixos obedecem um modelo básico de expressão semelhante ao já descrito para inibidores de tripsina, com níveis sempre crescentes durante o desenvolvimento das sementes.

5 - Sementes quiescentes de feijão-de-corda pitiúba contêm  $4 \times 10^{-2}\%$  do peso seco em inibidores de papaína e  $5,2 \times 10^{-3}\%$  do peso seco em proteinases cisteínicas.

6 - A fração rica em inibidores de papaína de sementes quiescentes de feijão-de-corda pitiúba, obtida por

fracionamento em cromatografia de afinidade, apresenta uma purificação de 7.931 vezes e o rendimento alcançado neste processo é de 4%.

7 - Nas diversas espécies de plantas estudadas, os níveis de inibidores de papaína das sementes são baixos (ca.  $10^{-2}\%$  do peso seco) e aproximadamente constantes (2 décadas de variação), enquanto os inibidores de tripsina variam bastante (5 décadas), podendo alcançar até ca. de 6% do peso seco

8 - Não há, aparentemente, correlação entre grau evolutivo das diversas plantas estudadas e níveis de inibidores de papaína e tripsina.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, K. & ARAI, S. Purification of a cysteine proteinase inhibitor from rice, Oryza sativa L. japonica. Agric. Biol. Chem., 49 (11), 3349-3350 (1985).
- ABE, K., EMORI, Y., KONDO, H., SUZUKI, K. & ARAI, S. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (Oryzacystatin) - Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. The Journal of Biol. Chem., Vol. 262, N.35, 16793-16797 (1987).
- ABE, K., KONDO, H. & ARAI, S. Purification and characterization of a rice cysteine proteinase inhibitor. Agric. Biol. Chem., 51 (10), 2763-2768 (1987).
- ABE, K., KONDO, H. & ARAI, S. Purification and properties of a cysteine proteinase from germinating rice seeds. Agric. Biol. Chem., 51 (6), 1509-1514 (1987).
- ABE, M., ARAI, S., KATO, H. & FUJIMAKI, M. Thiol-protease inhibitors occurring in endosperm of corn. Agric. Biol. Chem., 44, 685-686 (1980).
- ABE, M. & WHITAKER, J.R. Purification and characterization of a cysteine proteinase inhibitor from the endosperm of corn. Agric. Biol. Chem., 52 (6), 1583-1584 (1988).
- AKERS, C.P. & HOFF, J.E. Simultaneous formation of chymopapain inhibitor activity and cubical crystals in tomato leaves. Can. J. Bot., 58, 1000-1003 (1980).

- ANASTASI, A., BROWN, M.A., KEMBHAVI, A.J., NICKLIN, M.J.H., SAYERS, C.A., SUNTER, D.C. & BARRETT, A.J. Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases - Improved purification from egg white, characterization and detection in chicken serum. Biochem. J., 211, 129-138 (1983).
- ARNON, R. Papain in Methods in Enzymology XIX: 226-234, Academic Press, New York (1970).
- ASHTON, F.M. Mobilization of storage proteins of seeds. Ann. Rev. Plant Physiol., 27, 95 (1976).
- BARRETT, A.J. In: Methods in Enzymology, Vol. 80, 771-778 (1981).
- BARRETT, A.J. et al. Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. Biochem. J., 236, 312 (1986).
- BARRETT, A.J. The cystatins: a new class of peptidase inhibitors., TIBS, 12, 193-196 (1987).
- BAUMGARTNER, B. & CHRISPPEELS, M.F. Partial characterization of a protease inhibitor which inhibits the major endopeptidase present in the cotyledons of mung beans. Plant Physiol., 58, 1-6 (1976).
- BAUMGARTNER, B. & CHRISPPEELS, M.F. Purification and characterization of vicilin peptidohydrolase, the major endopeptidase in the cotyledons of mung-bean seedlings. Eur. J. Biochem, 77, 223-233 (1977).
- BODE, W., ENGH, R., MUSIL, D., THIELE, U., HUBER, R., KARSHIKOV, A., BRZIN, J., KOS, J. & TURK, V. The 2.0 Å x-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases.

The EMBO Journal, Vol. 7, N. 8, 2593-2599 (1988).

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254 (1976).
- BRAGA, R. In: Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará. Coleção Mossoroense, Vol. XLII, 3a. Edição Comemorativa ao II Congresso Brasileiro de Florestas Tropicais, Mossoró (1976).
- CARASCO, J.F. & XAVIER-FILHO, J. Sequential expression of trypsin inhibitors in developing fruit of cowpea (Vigna unguiculata (L.) Walp.). Ann. Bot., Vol. 47, 259-266 (1981).
- HEINRIKSON, R.L. & KEZDY, F.J. Acid cysteine protease inhibitors from pineapple stem. In: Methods in Enzymology, 45, Lorand, L., Ed. Academic Press, New York, 740 (1976).
- HJELM, H., SJÖDAHL, J. & SJÖQUIST, J. Immunologically active and structurally similar fragments of protein A from Staphylococcus aureus. Eur. J. Biochem., 57, 395-403 (1975).
- JULIANO, M.A. & JULIANO, L. Synthesis and kinetic parameters of hydrolysis by trypsin of some acyl-arginyl-p-nitroanilides and peptides containing arginyl-p-nitroanilide. Brazilian J. Med. Biol. Res., 18, 435-445 (1985).
- KORTH, M.J., FINN, D.J. & GUSTAFSON, G.L. Use of a western blotting technique in the purification of a cysteine proteinase inhibitor. Analyt. Biochem., 169, 181-184 (1988).

- KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. J. Gen. Physiol., 30, 291-310 (1947).
- LASKOWSKI, M. Jr. & KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. Ann. Rev. Biochem., 49, 593-626 (1980).
- LIMA, G.A. In: Cultura do Feijão de Corda, 2, 27-29 (1980).
- LINDAHL, P., ALRIKSSON, E., JÖRNVALL, H & BJÖRK, I. Interaction of the cysteine proteinase inhibitor chicken cystatin with papain. Biochem., 27, 5074-5082 (1988).
- LOWRY, O.H., RAERBROUGH, M.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951).
- MIKOLA, J. Proteinases, peptidases and inhibitors of endogenous proteinases in germinating seeds. In: Seed Proteins, Daussant, J., Mossé, J. & Varsghan, J., Eds., Academic Press, London, 35 (1983).
- MITSUHASHI, W. & MINAMIKAWA, T. Synthesis and post-translational activation of sulfhydryl-endopeptidase in cotyledons of germinating Vigna mungo seeds. Plant Physiol., 89, 274-279 (1989).
- MÜNTZ, K., RUDOLPH, A., SCHLESIER, G. & SILHENGST, P. The function of the pericarp in fruits of crop legumes. Kulturpflanze, 26, 37-67 (1978).
- NIELSEN, S.S. & LIENER, I.E. Degradation of the major storage protein of Phaseolus vulgaris during germination. Plant Physiol., 74, 494 (1984).
- OLIVA, M.L.V. Isolamento e caracterização preliminar de inibidores de proteinases de sementes de Enterolobium contortisiliquum, Torresea cearensis, Bauhinia pentandra e Bauhinia bauhinioides. Tese de Doutorado defendida na

Escola Paulista de Medicina (1988).

OLIVA, M.L.V., SAMPAIO, M.U. & SAMPAIO, C.A.M Serine - and SH-proteinase inhibitors from Enterolobium contortisiliquum beans. Purification and preliminary characterization. Brazilian J. Med. Biol. Res., 20, 767-770 (1987).

OKUDA, S., KANEKO, J., OGAWA, T., YAMAGUCHI, T., IZAKI, K. & TAKAHASHI, H. Increase in enzyme activities in embryonic axes of soybean seeds during germination. Agric. Biol. Chem., 51 (1), 109-113 (1987).

PEOPLES, M.B., ATKINS, C.A., PATE, J.S. & MURRAY, D.R. Nitrogen nutrition and metabolic interconversions of nitrogenous solutes in developing cowpea fruits. Plant Physiol., 77, 382-388 (1985).

PERLSTEIN, S.H. & KEZDY, F.J. Isolation and characterization of a protease inhibitor from commercial stem bromelain acetone powder. J. Supramol. Struct., 1, 249-254 (1973).

PORATH, et al., J. Chromatog., 86, 53-56 (1973).

PUSZTAI, A., CROY, R.R.D., GRANT, G. & STEWART, J.C. Seed lectins: distribution, location and biological role. In: Seed Proteins, Doussant, J., Mossé, J. & Varsghan, J. Eds., Academic Press, New York, 53-82 (1983).

RAACKE, I.D. Biochem. J., 66, 110 (1957). Citado por DURE, L.S. (1975).

RELE, M.V., VARTAK, H.G. & JAGANNATHAN, V. Proteinase inhibitors from Vigna unguiculata subsp. cylindrica. I. Occurrence of thiol proteinase inhibitors in plants

- and purification from Vigna unguiculata subsp. cylindrica, Arch. Biochem. Biophys., Vol. 204, N. 1, 117-128 (1980).
- RICHARDSON, M. The proteinase inhibitors of plants and microorganisms. Phytochem., 16, 159-169 (1977).
- RODIS, P. & HOFF, J.E. Nature and function of cubical protein crystals in Solanum tuberosum L., PhD thesis, Purdue University, West Lafayette (1974).
- RYAN, C.A. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants leaves - a biochemical model for pest-induced natural plant protection, TIBS, 5, 148-151 (1973).
- RYAN, C.A. Proteinase inhibitors. In: The Biochemistry of Plants, Vol. 6, Cap. 9, 351-369 (1981).
- RYAN, C.A. Proteinase inhibitor gene families: Strategies for transformation to improve plant defenses against herbivores. Bio Essays, Vol. 10, Nº 1, 20-24 (1989).
- RYAN, C.A. & WALKER-SIMMONS, M. Plant proteinases. In: The Biochemistry of Plants, Vol. 6, Cap. 8, 321-346 (1981).
- SALMIA, M.A. Inhibitors of endogenous proteinases in Scots pine seeds: fractionation and activity changes during germination. Physiol. Plant, 48, 266 (1980).
- SCHULTZ, A.R. In: Introdução ao Estudo da Botânica Sistemática, Livraria do Globo, Porto Alegre (1943).
- SHUTOV, A.D. & VAINTRAUB, I.A. Degradation of storage proteins in germinating seeds. Phytochem., Vol. 26, N. 6 1557-1566 (1987).
- STOREY, R.D. & WAGNER, F.W. Plant proteases: a need for uniformity. Phytochem., Vol. 25, Nº 12, 2701-2709 (1986).

- VAINTRAUB, A. & ROPOT, E.S. Cysteine proteinase from germinating sunflower seeds. Partial purification and effects on 11S storage protein. Biochem., 53(5), 672-676 (1988).
- VARTAK, H.G., RELE, M.V. & JAGANNATHAN, V. Proteinase inhibitors from Vigna unguiculata subsp. cylindrica. III. Properties and kinetics of inhibitors of papain, subtilisin and trypsin. Arch. Biochem. Biophys., Vol. 204, N. 1, 134-140 (1980).
- VERWEY, E.F. A type-specific protein derived from the staphylococcus. J. Exp. Med., 71, 635-644 (1940).
- WIEN, H. C. & SUMMERFIELD, R.J. Cowpea (Vigna unguiculata (L.) Walp.). In: The Physiology of Tropical Field Crops, Cap. 10, 353-383 (1984).
- WINSTON, S.E., FULLER, S.A. & HURRELL, J.G.R. Western blotting. In: Current Protocols in Molecular Biology, 10.8.1-10.8.6, John Wiley & Sons Ed., Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (1987).
- WOOD, J.N. Solid-phase screening of monoclonal antibodies. In: Methods in Molecular Biology, 1, 279-286, John M. Walker Ed., Humana Press, New Jersey (1984).
- XAVIER-FILHO, J. Trypsin inhibitors during germination of Vigna sinensis seeds. Physiol. Plant, Vol. 28, 149-154 (1973).
- XAVIER-FILHO, J. Trypsin inhibitors in sorghum grain. J. Food Science, Vol. 39, 422 (1974).
- XAVIER-FILHO, J. & CAMPOS, F.A.P. Proteinase Inhibitors. In: Toxicants of Plant Origin, Vol. III, Cap. 1, Cheeke, P.R. Ed., CRC Press, Boca Raton, Florida (1989).

- XAVIER-FILHO, J., CAMPOS, F.A.P., ARY, M.B., PERES SILVA, C., CARVALHO, M.M.M., MACEDO, M.L.R., LEMOS, F.J.A. & GRANT, G. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (Vigna unguiculata) and the resistance/susceptibility to predation by Callosobruchus maculatus. J. Agric. Food Chem., 37, 1139-1143 (1989).
- ZIMACHEVA, A.V., IEVLEVA, E.V. & MOSOLOV, V.V. Cysteine proteinase inhibitor from pumpkin seeds. Biochem., 53 (5), 640-645 (1988).
- ZUCKER, S., BUTTLE, D.J., NICKLIN, M.J. & BARRETT, A. The proteolytic activities of chymopapain, papain and papaya proteinase III. Biochem. Biophys. Acta, 828, 196-204 (1985).
- YOMO, H. SRINIVASEN, K. Plant Physiol., 52, 671-673 (1973). Citados por BEWLEY, J.D. & BLACK, M. In: Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1978).