

ATIVIDADE ANTI-TRÍPTICA EM SEMENTES DE
Canavalia brasiliensis Mart.

Francisco de Assis de Paiva Campos

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

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

1980

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

A transcrição do material contido neste dissertação é permitida desde que se faça a citação necessária.

Francisco de Assis de Paiva Campos

José Xavier Filho
Orientador da Dissertação

data

Iracema Lima Ainouz

data

Renato de Azevedo Moreira

data

À memória de meu pai, Casemiro,
à minha mãe, Olinda
e a meus irmãos Pedro, Maria do Céu, Irapuan
Ubiratan, José, Odília, Odaléa e Bernadete.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor José Xavier Filho, pela orientação segura, dedicada e estimulante.

À Professora Iracema Lima Ainouz, pelo exemplo de dedicação e amor ao trabalho.

Aos Professores Renato de Azevedo Moreira e Maria da Guia Silva Lima, pelas sugestões e estímulos.

Aos demais professores, colegas e funcionários, pelos ensinamentos e pela amizade.

Às Professoras Neire Amorim e Marly Reis Itaboraí, pelas alegrias, conhecimentos e estímulos recebidos quando, orgulhoso, tinha-as como professoras.

Este trabalho foi realizado graças a auxílios recebidos das seguintes instituições:

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

Coordenação do Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES), através de bolsa de Pós-Graduação.

ÍNDICE

	Página
Índice de Figuras	VIII
Índice de Tabelas	X
Abreviaturas	XI
Resumo	XII
I. Introdução	1
II. Materiais e Métodos	10
A. Materiais	10
1. Planta	10
2. Outros materiais	10
B. Métodos	11
1. Preparação dos extratos	11
2. Determinação de proteinases e inibidores	12
3. Determinação de proteínas	14
4. Purificação parcial dos inibidores	15
4.1. Fracionamento por diálise do Extrato Bruto de cotilédones	15
4.2. Fracionamento por filtração em gel de dextrana	15
4.3. Fracionamento em coluna de Sepharose-4B-anidro- tripsina	16
5. Caracterização parcial dos inibidores	18
5.1. Espectro de absorção	18
5.2. Ação do calor sobre a atividade inibitória da F-Sephadex	18
5.3. Ação da pepsina sobre a atividade inibitória da F-Sephadex	18
5.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (pH 8,1)	19
5.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS	19
5.6. Eletrofocalização em placas de gel de poliacri- lamida	20
III. Resultados	22
1. Extração de proteína e inibidores de eixo e coti- lédones	22
2. Distribuição de inibidores de tripsina nas se- mentes	22

3. Distribuição dos inibidores de tripsina em cotilédones	22
4. Distribuição das atividades inibitórias entre as frações albumínicas e globulínicas de eixo e cotilédones	27
5. Purificação parcial dos inibidores de tripsina de cotilédones	27
6. Caracterização parcial dos inibidores de tripsina de cotilédones	27
6.1. Espectro de absorção	27
6.2. Ação do calor sobre a atividade inibitória da F-Sephadex	32
6.3. Ação da pepsina sobre a atividade inibitória da F-Sephadex	32
6.4. Reação com tripsina bovina e tripsina porcina.	32
6.5. Estequiometria da reação inibidor-tripsina ...	36
6.6. Pontos isoelétricos	40
6.7. Pêso molecular	40
IV. Discussão	52
V. Conclusões	57
VI. Bibliografia	58
VII. Comunicações a Congressos	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Rendimento de extrações sucessivas de atividade anti-tríptica de farinha de cotilédones e de eixo	23
2	Rendimento de extrações sucessivas de proteína de farinha de cotilédones e eixo	24
3	Cromatografia em Sephadex G-100 da fração albumínica de cotilédones	29
4	Cromatografia em coluna de Sepharose-4B-anidrotripsina da fração ativa separada por Sephadex G-100	30
5	Espectro de absorção da F-Albumina, F-Sephadex e F-Sepharose	33
6	Inativação térmica dos inibidores de tripsina (F-Sephadex)	34
7	Ação da F-Sepharose sobre tripsina bovina, medida pela hidrólise de BAPA e caseína	37
8	Ação da atividade inibitória da F-Albumina sobre tripsina bovina e tripsina porcina	39
9	Cromatografia de afinidade em Sepharose-4B-anidrotripsina da F-Sephadex	41
10	Eletrofocalização em placa de gel de poliácridamida das F ₁ , F ₂ e F ₃	42
11	Eletrofocalização em placa de gel de poliácridamida do Extrato Bruto, F-Albumina, F-Sephadex e F-Sepharose	43
12	Padrão de eluição de proteína e inibidores de Extrato Bruto de cotilédones em coluna de Sephadex G-100 a pH 7,6	44

Figura		Página
13	Padrão de eluição de proteína e inibidores da F-Sepharose, em coluna de Sephadex G-100 a pH 7,6	45
14	Padrão de eluição de proteína e inibidores da F-Albumina de cotilédones, em coluna de Sephadex G-100, a pH 2,4	46
15	Padrão de eluição de proteína e inibidores da F-Sepharose, em coluna de Sephadex G-100 a pH 2,4	47
16	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS do Extrato Bruto, F-Albumina, F-Sephadex e F-Sepharose; revelação para inibidores de tripsina	48
17	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS do Extrato Bruto, F-Albumina, F-Sephadex e F-Sepharose; revelação para proteína	50
18	Eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,1 do Extrato Bruto, F-Albumina, F-Sephadex e F-Sepharose; revelação para inibidores	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela		Página
I	Distribuição da atividade anti-tríptica nas <u>se</u> mentes	25
II	Distribuição da atividade anti-tríptica nos <u>co</u> tilédones	26
III	Distribuição da atividade inibitória contra tripsina entre as frações albumínica e globulí nica de cotilédones e eixo	28
IV	Tabela de purificação de inibidores de tripsina dos cotilédones	31
V	Ação da pepsina sobre a atividade anti-tríptica da F-Sephadex	35

ABREVIATURAS USADAS

- F-Albumina - Fração albumínica obtida por diálise do Extrato Bruto contra tampão acetato e contra água.
- F-Sephadex - Fração com atividade anti-tríptica obtida por cromatografia em coluna de Sephadex G-100 da F-Albumina.
- F-Sepharose- Fração com atividade anti-tríptica obtida por cromatografia em coluna de Sepharose-4B-anidrotripsina da F-Sephadex.
- F₁ - Primeira fração com atividade anti-tríptica obtida por eluição da coluna de Sepharose-4B-anidrotripsina com tampão acetato 0,1M-NaCl 0,3M, pH 4,0.
- F₂ - Segunda fração com atividade anti-tríptica obtida por eluição da coluna de Sepharose-4B-anidrotripsina com tampão acetato 0,1M-NaCl 0,3M, pH 4,0.
- F₃ - Fração com atividade anti-tríptica obtida por eluição da coluna de Sepharose-4B-anidrotripsina com HCl 0,1M-NaCl 0,3M, pH 2,0.
- APNE - N-acetil-DL-fenilalanina- β -naftil-ester
- BAPA - α - Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida
- NPGB - p-Nitrofenilguanidinobenzoato
- PMSF - Fenilmetilsulfonilfluoreto
- SDS - Sódio dodecil sulfato
- TCA - Ácido tricloroacético
- TLCK - N- α -p-Tosil-L-lisina-clorometilcetona
- UI - Unidades de inibidor

RESUMO

A atividade anti-trípica de cotilédones de Canavalia brasiliensis Mart., foi isolada através de cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-100) e cromatografia de afinidade (Sephrose-4B-anidro-tripsina), a partir da fração albumínica, purificada 99 vezes, com um rendimento de 34%.

Nos experimentos de cromatografia de exclusão molecular a pH 7,6 e pH 2,4, a atividade inibitória de todas as preparações é eluída num volume equivalente a um peso molecular de 25,000 daltons, aproximadamente. A partir de experimentos de determinação da estequiometria da reação dos inibidores, com tripsina bovina, utilizando caseína e BAPA como substratos, foram calculados pesos moleculares de 21.500 e 20.500 daltons, respectivamente e uma constante de inibição da ordem de 10^{-8} M. Por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS é detectada uma única banda, com peso molecular de 11.500 daltons, indicando que os inibidores se associam, provavelmente como dímeros e que a associação é bastante forte, não sendo desfeita nas condições empregadas.

A fração ativa proveniente da coluna de afinidade tem um máximo de absorção em 270 nm, é lábil ao calor em meio alcalino e estável em meio ácido e é parcialmente resistente à hidrólise por pepsina em meio ácido.

A atividade inibitória contra tripsina porcina tem uma potência aproximadamente duas vezes maior que para tripsina bovina.

A fração ativa isolada por cromatografia de afinidade, quando examinada por focalização isoelétrica se apresenta heterogênea mostrando que a atividade anti-trípica de C. brasiliensis Mart., é constituída por uma família de inibidores, com pontos isoelétricos entre 4,35 e 5,35.

I - INTRODUÇÃO

Os inibidores naturais de enzimas proteolíticas são proteínas de origem animal, vegetal ou microbiana, que podem se as sociar com uma ou mais enzimas proteolíticas para formarem com plexos de estequiometria definida, nos quais todas as funções catalíticas dessas enzimas são competitivamente inibidas (27, 28, 30). Esta característica sugeriu aos primeiros pesquisado res que esses complexos se constituiriam num excelente sistema para o estudo das interações proteína-proteína. A inibição com petitiva das diferentes classes de enzimas proteolíticas suge ria, por outro lado, que esses inibidores poderiam exercer uma importante função nos processos fisiológicos dependentes de de proteólise total ou parcial de proteínas e peptídeos. Dessa ma neira, a caracterização e o estudo das diferentes propriedades desses inibidores tem interessado a uma ampla gama de especia listas, tais como bioquímicos, farmacologistas, nutricionistas, fisiologistas, etc. Parte significativa dessas investigações , não obstante os diferentes enfoques, convergem a um mesmo obje tivo, qual seja, o de esclarecer o significado fisiológico da ocorrência e da ampla distribuição dessas substâncias entre os seres vivos.

Inibidores naturais de enzimas proteolíticas de origem vegetal

Os inibidores naturais de enzimas proteolíticas são de ocorrência muito ampla entre os vegetais, principalmente nas plantas com sementes. Entre as dicotiledôneas, as famílias das leguminosas e solanáceas englobam o maior número de espécies contendo esses inibidores; nas monocotiledôneas eles são mais amplamente distribuídos entre as gramíneas (24). Apesar de sua ocorrência generalizada, a quantidade de inibidores presentes nas várias espécies é extremamente variável, mesmo entre espé cies do mesmo gênero e até mesmo entre variedades de uma mesma espécie (28).

Distribuição na planta

A maior parte dos inibidores até agora detectados em plantas está presente nas sementes. Sua localização, no entanto, não se restringe a este órgão, tendo já sido isolados inibidores de folhas, tubérculos e raízes (27). Existem ainda indicações de que, em um mesmo órgão, a distribuição dos inibidores pode não ser uniforme, como é o caso dos inibidores de tripsina e de quimiotripsina nos cotilédones de Vigna unguiculata (44). Em batata, um mesmo tipo de inibidor, inibidor I de quimiotripsina, isolado por Ryan e Balls, tem uma existência transitória em todos os tecidos da planta, exceto no xilema e nas sementes onde eles estão ausentes (32).

Propriedades físicas e químicas

Os inibidores de origem vegetal são proteínas com pouca ou nenhuma quantidade de carboidratos em suas moléculas; geralmente são moléculas de pequeno peso molecular, na faixa de 5.000 a 80.000 daltons. A maioria deles tem peso molecular entre 8.000 e 10.000 daltons e aqueles de peso molecular aparentemente grande, são geralmente proteínas poliméricas, normalmente di, tri ou tetraméricas, cujos protômeros têm peso molecular mínimo em torno de 10.000 daltons (28). Eles apresentam um alto conteúdo de cistina; todos aparentemente contêm prolina e muitos não contêm triptofano. Muitos dos inibidores apresentam estabilidade a condições desnaturantes (calor, uréia, solventes orgânicos, ácidos, bases, etc.) fato pouco comum entre a maioria das proteínas (20).

Especificidade e reação com proteases

Já foram isolados a partir de plantas, inibidores das quatro classes de enzimas proteolíticas (proteases serínicas, proteases sulfidrílicas, metaloproteases e proteases ácidas). Os mais estudados são os das proteases serínicas (28). Muitos deles inibem tanto tripsina como quimiotripsina, podendo a liga

ção dessas enzimas ao inibidor ocorrer em um mesmo sítio reativo ou em sítios reativos diferentes. Existem relatos sobre inibidores de proteases serínicas que também são ativos contra enzimas de outras classes: o inibidor de tripsina e de quimiotripsina de "broad beans" (46) também inibe papaína, uma protease sulfidrílica; o inibidor de tripsina de soja (Kunitz) inibe a clostripaína, uma enzima microbiana semelhante à tripsina, mas tendo um sítio catalítico de uma protease sulfidrílica (35).

Estrutura/atividade

O mecanismo de inibição apresentado pelos inibidores naturais de enzimas proteolíticas está sendo melhor entendido à medida que se está elucidando a sequência de aminoácidos de vários deles. Estes estudos de determinação de estrutura primária, bem como de níveis estruturais mais elevados, juntamente com estudos termodinâmicos, cinéticos, etc., levaram Ryan e Feeney (33) à conclusão que:

1. Os inibidores formam complexos fortemente associados, fisicamente demonstráveis;
2. um único resíduo de aminoácido no inibidor, usualmente um resíduo compatível com a especificidade de substrato da enzima, é requerido para a atividade inibitória;
3. o fato da enzima ser ou não cataliticamente ativa, não tem papel essencial na formação do complexo.

A sequência de aminoácidos, bem como a localização das pontes dissulfeto (quando existentes) e a determinação da posição e composição do sítio reativo de vários inibidores já foram determinadas e no caso dos inibidores de tripsina e quimiotripsina, é observada uma homologia sequencial no sítio reativo (28). Esses inibidores têm em comum ainda o fato de que seus sítios reativos têm uma forma de laço, originado pela formação de pontes dissulfeto entre resíduos de cisteí

na (27). No caso dos inibidores de tripsina e de quimiotripsina, alguns estudos mostram que os dois aminoácidos unidos pela ligação peptídica que é rompida durante o curso da inibição, são fundamentais não para a formação do complexo, mas sim para dar especificidade ao inibidor. Isto foi demonstrado por estudos de substituição de resíduos de aminoácidos no sítio reativo do inibidor de Kunitz (20). O papel do sítio reativo e sua clivagem durante o processo de inibição é um assunto controverso. Laskowski e col. (20, 26) sugeriram que a quebra da ligação peptídica e a formação de uma acil-enzima, acompanhada pela hidrólise da ligação peptídica, eram essenciais para a formação de complexos e que estes eram fenômenos relacionados. Isto foi realmente demonstrado para uma grande variedade de inibidores. No entanto, Ako, Foster e Ryan (2, 3) mostraram que nem a resistência nem a suscetibilidade à hidrólise do sítio reativo desempenham um papel primário no mecanismo de inibição. Eles demonstraram que quimiotripsina inativa e inibidor de batata formam complexos estáveis.

O fato dos inibidores apresentarem sítios reativos bem definidos e semelhantes, levou alguns pesquisadores a se interessarem em determinar se os diferentes inibidores encontrados em legumes diferem nos seus determinantes antigênicos e também estabelecer relação entre esses determinantes antigênicos e os sítios reativos. Estes estudos, feitos com o inibidor de Bowman-Birk, mostraram que o sítio inibitório contra tripsina não é idêntico ao seu sítio antigênico (6).

Mecanismo de interação

Os estudos da estrutura de complexos enzima-inibidor, têm sugerido que, para os inibidores de tripsina, o mecanismo de inibição é semelhante: o inibidor tem uma orientação em relação à enzima semelhante a de um substrato verdadeiro, ligando-se a ela de modo a bloquear o seu sítio ativo. As estruturas de muitos complexos enzima-inibidor foram determinadas a diferentes graus de resolução (7, 36). Em alguns casos foi determi

nado a posição de aminoácidos e átomos situados na região de interação direta entre a enzima e o inibidor. A resolução dessas estruturas permitiu que se fizesse uma série de determinações importantes para o entendimento do mecanismo de interação proteína-proteína, em geral e em particular do mecanismo de interação enzima-inibidor, como sejam: interações de van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações covalentes e todas as interações que originassem ou consumissem energia de origem entrópica e entálpica, para assim explicar a especificidade da ligação enzima-inibidor (7, 36).

A maneira pela qual se dá a interação enzima-inibidor e a reação de hidrólise (nos tipos de interação onde ela ocorre) da ligação peptídica do sítio reativo do inibidor é análoga à hidrólise de um substrato verdadeiro.

O uso de difração de raios-X permitiu o estudo do complexo enzima-inibidor em vários níveis: 1º - o agregado dimérico; 2º - a estrutura e a conformação de cada uma das moléculas que formam o complexo e 3º - a região de contato entre a enzima e o inibidor. Estes estudos levaram às seguintes conclusões (20):

- 1a. - Os inibidores se ligam à enzima como bons substratos, indicando que o sítio reativo dos diferentes inibidores de tripsina têm conformação semelhante;
- 2a. - a energia que permite a alta constante de ligação enzima-inibidor é derivada do somatório das energias vindas de muitos tipos de interações as quais, em grande parte, são de natureza entrópica;
- 3a. - o complexo existe na forma de um aduto tetraédrico estável.

Significado nutricional

Juntamente com as fitohemaglutininas, glicosídeos cianogênicos, fatores antivitaminicos, fatores estrogênicos, aminoácidos tóxicos, etc., os inibidores de tripsina formam uma classe

de substâncias que contribuem para a baixa qualidade nutricional de muitos alimentos de origem vegetal, principalmente legumes (21, 23, 24).

Como muitos tipos de sementes contêm uma grande variedade de fatores antinutricionais, além dos inibidores de tripsina, até agora não foi possível se fazer uma generalização acerca das consequências que a ingestão de inibidores de tripsina acarreta para um organismo. Assim, muitos dos dados existentes são conflitantes. No entanto, é fato comprovado que em muitos animais a ingestão de inibidores de tripsina tem como consequência imediata a hipertrofia pancreática. Essa hipertrofia é evitada caso os inibidores hajam sido previamente inativados. Além desse fato, a ingestão de inibidores acarreta uma queda no valor de PER (protein efficiency ratio). Esse efeito também desaparece caso os inibidores hajam sido previamente inativados. Em cobaias esses efeitos se manifestam pelo grande retardamento do crescimento em relação aos controles e, em casos extremos, pela morte (21,22, 23).

Os estudos sobre o significado nutricional de inibidores têm sido efetuados principalmente usando sementes de leguminosas. Esses estudos ainda não apresentaram resultados definitivos. Como mencionamos acima, além da presença de fatores antinutricionais que não os inibidores de tripsina, outros fatores concorrem para dificultar ainda mais o estabelecimento do significado nutricional desses inibidores, como sejam, a resistência à hidrólise das proteínas de reserva das sementes, como no caso da soja e também a falha dos métodos para estimação da quantidade total de inibidores presentes nas sementes (21,22,23).

Embora seja fato comprovado que a presença de inibidores de tripsina na dieta de animais de laboratório leva a um retardamento no crescimento e até mesmo à morte desses animais, alguns autores sugerem que os inibidores de tripsina, pelo menos os inibidores de soja, não inibem a tripsina humana (14, 22,23).

Significado fisiológico

Embora os estudos mais aprofundados para o conhecimento dos inibidores tenham se iniciado na década de 30, há apenas poucos anos o significado fisiológico desses inibidores na planta vem sendo estudado. Tanto sua ampla distribuição no reino vegetal, como o fato de eles estarem presentes geralmente em grandes quantidades, além das similaridades estruturais e de especificidade entre os inibidores de diferentes fontes (o que indica a conservação do sítio ativo por milhares de anos de evolução) sugerem que a manutenção da capacidade inibitória é importante para a sobrevivência e, portanto, eles não desempenhariam um papel meramente passivo na planta.

Os estudos até agora feitos sobre o significado fisiológico para a planta dos inibidores naturais de enzimas proteolíticas, levaram ao estabelecimento de quatro prováveis papéis que eles desempenhariam, os quais não se excluem mutuamente (23,27,30):

- 1º - Agentes reguladores que controlariam a atividade de proteases endógenas - Em diversas espécies (soja, feijão, cevada, batata, etc.) (28,39) já foram detectados inibidores que inibem proteases endógenas dessas espécies.
- 2º - Proteínas de reserva - A hipótese de que os inibidores atuariam como proteínas de reserva, foi primeiramente sugerida pelo fato de eles estarem presentes em grandes quantidades nos órgãos de reserva (cotilédones, tubérculos, etc.). Os inibidores também estão presentes em outras partes da planta. Em alguns casos essa presença é transitória, indicando portanto, um possível papel de reserva temporária. Em algumas espécies a quantidade de inibidores decresce ao longo da germinação (39).
- 3º - Agentes protetores contra proteases de microorganismos e insetos - Como muitas das enzimas secretadas

por microorganismos com a finalidade de hidrolisarem as proteínas existentes nas paredes celulares são do tipo tripsina, a presença de inibidores de tripsina na planta dificultaria a penetração de microorganismos. Muitos inibidores de origem vegetal inibem as enzimas digestivas do trato intestinal de insetos e suas larvas (28). Assim, alguns autores sugerem que os inibidores surgiram como um mecanismo de defesa da planta contra o ataque de insetos. Um dos trabalhos mais recentes abordando este aspecto é o de Ryan (31), mostrando que o ataque de insetos a folhas de tomateiro induz a liberação de um hormônio (PIIF - "proteinase inhibitor inducing factor") que rapidamente se distribui por toda a planta, provocando a síntese acelerada de inibidores.

- 4º - Uma outra função que é sugerida para os inibidores é que eles provavelmente teriam um importante papel na dispersão endozóica das sementes (28). Pássaros e outros animais que se alimentam de frutos ou plantas inteiras, frequentemente excretam sementes em condições viáveis. A presença de inibidores em concentração relativamente alta, aumentaria a probabilidade de as sementes passarem através do sistema digestivo sem serem danificadas pelas enzimas digestivas dos insetos.

Objetivos

O presente trabalho pretende contribuir para um maior conhecimento de aspectos bioquímicos básicos relacionados com os inibidores de tripsina presentes em Canavalia brasiliensis Mart., purificando parcialmente esses inibidores, utilizando métodos que possibilitem a minimização de alterações em

suas estruturas e propriedades e em seguida caracterizando al
gumas de suas propriedades químicas.

II - MATERIAIS E MÉTODOS

A. Materiais1. Planta

A planta de Canavalia brasiliensis Mart., apresenta caule volúvel, glabro ou pubescente, principalmente nas partes mais jovens. Folha trifoliolada, folíolos ovóides ou largamente cuneados, subagudos ou acuminados; flôres pêndulas purpúreo-violáceas, de 2,2 cm de comprimento, dispostas em inflorescências cujo comprimento atinge, no mínimo, 15 cm; legume com três costelas longitudinais em cada valva, medindo cerca de 15 cm de comprimento e 4,5 cm de largura. A semente é escura elíptico-oval, com hilo oblongo (5).

Esta leguminosa é conhecida em algumas regiões do Nordeste pelo nome vulgar de feijão de boi.

As sementes utilizadas nestes estudos, foram coletadas no município de Iguatú-CE, no segundo semestre do ano de 1978.

2. Outros materiais

Tripsina bovina - Preparação duas vezes cristalizada. Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA.

Tripsina porcina - Preparação cristalizada. Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA.

Pepsina - Preparação três vezes cristalizada. Nutritional Biochemicals Corporation (NBCo), EUA.

Caseína - Preparada segundo Hammarsten. E. Merck AG Darmstadt, Alemanha.

L-N-Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida - Preparação cristalina. Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA.

N-Acetil-DL-fenilalanina- β -naftil-ester -Preparação cristalina
Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA.

O-Dianisidina tetrazotizada - E. Merck AG Darmstadt,
Alemanha.

Anfólitos carreadores (pH 3-6) - LKB-Produkter AB, Sué
cia.

p-Nitrofenilguanidinobenzoato - ICN Pharmaceuticals, Inc.
Cleveland, Ohio, EUA.

N- α - Tosil-L-lisina-clorometilcetona - Sigma Chemical
Company, St. Louis, EUA.

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analí
tico e obtidos comercialmente.

B. Métodos

1. Preparação dos extratos

A extração dos inibidores presentes em cotilédones, eixo e tegumento, foi feita a partir da farinha obtida triturando-se esses órgãos em moinho adaptado com peneiras de 60 mesh (malha por polegada linear). Tampão fosfato 0,1M, pH 7,6 foi utilizado como extraente, na proporção final de farinha/meio de extração de 1:10 (p/v). Numa primeira etapa a extração era feita na proporção de 1:5 (p/v) a 4°C, por 30 minutos, sob agitação constante, após o que o material era centrifugado a 1.270 x g, por 15 minutos. O sobrenadante era então coletado e o precipitado ressuspensão em uma quantidade de tampão igual à utilizada na primeira etapa. Esta segunda extração era feita do mesmo modo que a primeira e o sobrenadante obtido reunido ao primeiro. O extrato final assim obtido, foi denominado Extrato Bruto.

Em experimentos preliminares a extração foi feita em cinco etapas sucessivas, como descrito acima e a atividade inibitória e concentração de proteínas, foram determinadas em cada

um dos sobrenadantes das sucessivas etapas. Quando necessário, o resíduo obtido na última etapa de extração era liofilizado, acondicionado em frasco de vidro e armazenado a -17°C .

Para investigar a possível existência de um gradiente de concentração de inibidores nos cotilédones, estes foram seccionados em três partes: proximal, mediana e distal. Os extratos destas seções foram preparados da maneira já descrita.

2. Determinação de proteinases e inibidores

a. Tripsina

As soluções de tripsina bovina e tripsina porcina foram preparadas dissolvendo-as em HCl 0,0025N. A determinação da concentração de tripsina ativa nessas preparações foi obtida através da titulação com NPGb, pelo método de Chase e Shaw (9), utilizando um espectrofotômetro Varian de duplo feixe, no qual a hidrólise não enzimática do NPGb foi subtraída automaticamente, adicionando-se à cubeta de referência igual quantidade deste composto. A titulação foi feita adicionando-se à cubeta de referência 2,8 ml de tampão veronal 0,1M, pH 8,3 e 0,2 ml de HCl 0,0025N e, na cubeta da amostra, 2,8 ml de tampão veronal 0,1M, pH 8,3 e 0,2 ml da solução de tripsina. As cubetas foram então colocadas no espectrofotômetro, zerando-o a 410 nm. Em seguida foram retiradas, adicionando-se a cada uma delas 5 microlitros da solução de NPGb (3,38 mg/ml em dimetil formamida), efetuando-se de imediato a leitura da densidade ótica. A concentração de tripsina ativa foi calculada usando o coeficiente de extinção molar $E_{410 \text{ nm}}$ de $16.595 \text{ (l x mol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}\text{)}$.

Para determinação das atividades caseinolítica e BAPAásica da tripsina, foram utilizados os métodos de Kunitz (19) e Erlanger (12), respectivamente, sendo que os ensaios foram feitos da seguinte maneira:

Atividade caseinolítica - Uma alíquota de uma solução estoque

de tripsina bovina (0,4 mg/ml em HCl 0,0025N) diluída até uma concentração de aproximadamente 12 g/ml, foi sempre utilizada para os ensaios. A volumes crescentes dessa solução diluída, foram adicionados 1,0 ml de tampão fosfato 0,1M, pH 7,6 e em seguida HCl 0,0025N até um volume final de 2,0 ml. As soluções assim obtidas foram incubadas com 1,0 ml de caseína 1% (preparada em tampão fosfato 0,1M, pH 7,6) a 37°C. Após 30 minutos a reação foi parada pela adição de 3,0 ml de ácido tricloroacético (TCA) 5%. Após 30 minutos à temperatura ambiente, as suspensões foram filtradas em papel de filtro quantitativo. Do filtrado retiraram-se alíquotas de 1,0 ml, neutralizando-as, em seguida, com 0,05 ml de NaOH 2N. A atividade enzimática foi avaliada empregando-se o reagente de Folin, modificado por Lowry e col. (25). A densidade ótica foi determinada num fotocolorímetro Spekol a 750 nm. Provas em branco de concentrações extremas de tripsina foram preparadas sendo que neste caso, a adição de TCA precedeu à de caseína. Correções para concentrações intermediárias das provas em branco foram obtidas por interpolação.

Atividade BAPAásica - A volumes crescentes de soluções de tripsina bovina (0,3 mg/ml em HCl 0,0025N) ou tripsina porcina (0,0083 mg/ml em HCl 0,0025N), adicionou-se 0,5ml de tampão fosfato 0,1M, pH 7,6 e em seguida HCl 0,0025N até um volume final de 1,0 ml. As soluções assim obtidas foram incubadas com 2,0 ml de uma solução de BAPA $1,25 \times 10^{-3}M$, preparada dissolvendo-se inicialmente em cerca de 5% do volume final em dimetilsulfóxido e em seguida em tampão fosfato 0,1M, pH 7,6. Após 10 minutos de incubação a reação foi parada pela adição de 0,5 ml de ácido acético 30%, procedendo-se imediatamente a leitura da densidade ótica a 410 nm, em um espectrofotômetro Beckman Mod. DU. Provas em branco de concentrações extremas de tripsina foram preparadas, sendo que neste caso, a adição de ácido acético precedeu à de tripsina. Correções para concentrações intermediárias das provas em branco foram obtidas por interpolação.

b. Atividade dos inibidores

A atividade inibitória das diferentes preparações foi avaliada por comparação de amostras contendo quantidades crescentes de inibidor em presença de uma quantidade constante de enzima, com amostras contendo somente enzima. Foram feitas provas em branco da enzima, bem como de concentrações extremas de inibidor. As concentrações intermediárias foram determinadas por interpolação. Os métodos utilizados foram os de Kunitz e de Erlanger, já descritos e a atividade anti-tríptica foi expressa em unidades de inibidor (UI) definidas por Xavier-Filho (40).

3. Determinação de proteínas

A concentração de proteínas nas diferentes preparações, foi avaliada através da determinação de absorvância a 280 nm em um espectrofotômetro Beckman Mod. DU ou pelo método do microbiureto (16), ligeiramente modificado, usando albumina sérica bovina como padrão. Neste último caso, a volumes crescentes da preparação a ser analisada, adicionou-se tampão fosfato 0,1M, pH 7,6 até um volume final de 1,0 ml; em seguida a essa solução adicionou-se 3,0 ml de NaOH 4% e 0,2 ml do reagente do microbiureto. Após quinze minutos a densidade ótica é determinada a 330 nm em um espectrofotômetro Beckman Mod. DU. Provas em branco de concentrações extremas de proteína foram feitas nas quais o reagente do microbiureto não é adicionado. A leitura da densidade ótica dessas provas em branco era subtraída do valor da densidade ótica da solução que continha igual quantidade da preparação e à qual o reagente do microbiureto havia sido adicionado. Essa modificação permite eliminar a interferência de substâncias que absorvem em 330 nm quando tratadas por álcali.

4. Purificação parcial dos inibidores

Uma purificação parcial dos inibidores de tripsina de C. brasiliensis Mart., foi obtida de acordo com a sequência abaixo:

4.1. Fracionamento por diálise do Extrato Bruto de cotilédones

As frações albumínicas e globulínicas do Extrato Bruto de cotilédones foram obtidos dialisando-se o Extrato Bruto contra tampão acetato 0,033M, pH 5,0 por 48 horas e em seguida contra água destilada por mais 48 horas, a 4°C, utilizando-se sacos de diálise que excluam moléculas de peso molecular inferiores a 8.000 daltons. As frações albumínica (F-Albumina) e globulínica foram separadas por centrifugação a 16.500 x g por 20 minutos a 4°C, sendo em seguida liofilizadas e armazenadas a -17°C.

4.2. Fracionamento por filtração em gel de dextrana

Todas as experiências de cromatografia de exclusão molecular foram feitas utilizando-se uma coluna de 40 x 3,5 cm, com leito de Sephadex G-100, montada segundo as instruções do fabricante (34). Para fracionamento do Extrato Bruto e da Fração Albumina, a coluna foi equilibrada com tampão fosfato 0,1M pH 7,6 e a eluição foi feita com o tampão de equilíbrio. O fluxo da coluna foi ajustado para 3l ml/hora, coletando-se frações de aproximadamente 5,0 ml, através de um coletor automático de frações. A absorbância de cada fração foi lida a 280 nm em um espectrofotômetro Beckman Mod. DU. Após a eluição da fração de baixo peso molecular, a coluna foi lavada com uma solução de glicose 0,5M, para eluir lectinas adsorvidas ao gel de Sephadex (8)

Nos experimentos de cromatografia em meio ácido, feitas

da forma acima descrita, o equilíbrio e a eluição da coluna, bem como a dissolução da amostra foram feitos em ácido fórmico 0,1M, pH 2,4.

Nas cromatografias de albuminas, as frações com atividade de inibitória contra tripsina eram reunidas (F-Sephadex), dialisadas por 24 horas contra água destilada, liofilizadas e armazenadas a -17°C.

Nos experimentos acima foram feitas estimativas aproximadas de peso molecular da fração com atividade inibitória, através da equação derivada por Determan e Michel (11).

4.3. Fracionamento em coluna de Sepharose-4B-anidro-tripsina

As frações com atividade inibitória obtidas na etapa anterior a partir da fração albumínica, foram submetidas a cromatografia de afinidade em uma coluna de Sepharose-4B-anidro-tripsina.

O uso de anidro-tripsina como ligante em cromatografia de afinidade, elimina o problema da criação de formas artificiais quando do isolamento de inibidores utilizando enzima ativa como ligante (1,2), dado que neste caso, ocorrem consideráveis perdas de atividade, uma vez que a enzima ativa provoca a quebra de ligações peptídicas.

Anidro-tripsina é preparada tratando-se tripsina com fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), obtendo-se o derivado tripsina-PMS, que é tratado posteriormente com uma solução de KOH 0,5 M. O derivado assim obtido, difere da tripsina ativa pelo fato de naquele o resíduo de serina do sítio ativo haver sido transformado em desidroalanina. Este derivado apesar de enzimaticamente inerte, retém a capacidade de formar complexos estequiométricos com inibidores de proteases (1,2). O método de obtenção da Sepharose-4B-anidro-tripsina foi desenvolvido por Xavier-Filho (41), consistindo basicamente em:

- a. inativação da tripsina ativa com PMSF;

- b. preparação da anidro-tripsina através da eliminação do grupo sulfonil por tratamento alcalino;
- c. inativação da atividade enzimática residual em anidro-tripsina com p-toluenosulfonilclorometilcetona;
- d. acoplamento da anidro-tripsina com Sepharose-4B, ativada com brometo de cianogênio (CNBr).

Para a montagem da coluna de afinidade, foi utilizada uma seringa plástica com capacidade de 5,0 cc. Antes da montagem da coluna, a preparação de Sepharose-4B-anidro-tripsina foi novamente tratada com TLCK. Após esse tratamento a coluna foi montada até uma altura de 2,0 cm e sua capacidade de retenção de inibidores de tripsina foi determinada. Em cada experimento a coluna era equilibrada com tampão fosfato 0,1M - NaCl 0,3M, pH 7,6, aplicando-se em seguida a fração proveniente da coluna de Sephadex G-100 (F-Sephadex) dissolvida no tampão de equilíbrio, sendo em seguida eluída com 14 ml do mesmo tampão, coletando-se manualmente frações de 2,0 ml. O material retido na coluna era primeiramente eluído com 14,0 ml de tampão acetato 0,1M-NaCl 0,3M, pH 4,0 (F_1 e F_2) e depois com 14,0 ml de HCl 0,1M-NaCl 0,3M, pH 2,0 (F_3). Em ambos os casos, coletava-se manualmente frações de 2,0 ml. Em seguida a absorbância a 280 nm de cada uma das frações coletadas era determinada em um espectrofotômetro Beckman Mod. DU e era também determinada a atividade anti-trípica de cada uma delas, pelo ensaio de inibição da atividade BAPAásica da tripsina. Após essas determinações, aquelas frações com atividade anti-trípica eram reunidas e dialisadas por 48 horas contra água destilada, liofilizadas e armazenadas a -17°C .

Para a caracterização do conjunto dos inibidores retidos (F-Sepharose), a coluna foi eluída com tampão fosfato 0,1 M-NaCl 0,3M, pH 7,6 e subsequentemente com 14,0 ml de HCl 0,1M-NaCl 0,3M, pH 2,0. O material eluído nesta solução foi dialisado por 48 horas contra água destilada, liofilizado e armazenado a -17°C .

5. Caracterização parcial dos inibidores

5.1. Espectro de absorção

O espectro de absorção das diferentes preparações foi determinado automaticamente, utilizando-se um espectrofotômetro Varian de duplo-feixe, empregando-se cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho ótico. As soluções foram preparadas dissolvendo-se as frações liofilizadas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,6

5.2. Ação do calor sobre a atividade inibitória da F-Sephadex

A ação do calor sobre a atividade inibitória da F-Sephadex foi estudada incubando-se 2,0 ml de uma solução 2,94 mg/ml (em tampão fosfato 0,1M, pH 7,6) em tubos de ensaio com tampas esmerilhadas, a 27, 37, 50, 60, 80 e 100°C, após o que os tubos de ensaio foram mergulhados em banho de gelo. A atividade inibitória residual de cada um dos tratamentos era determinada, utilizando-se BAPA como substrato para a tripsina.

Quando se desejou estudar a ação do calor, a pH 2,4, sobre a atividade inibitória da F-Sephadex, 2,0 ml de uma solução contendo 1,0 mg/ml (preparada em ácido fórmico 0,1M, pH 2,4) foram incubados em tubos de ensaio com tampas esmerilhadas a 27, 37, 50, 60, 80 e 100°C por 30 minutos. Após esse tratamento, os tubos de ensaio foram mergulhados em banho de gelo, seguindo-se a adição a cada um deles de 10 ml de tampão fosfato 0,1M, pH 7,6. A atividade inibitória residual em cada um dos tratamentos foi determinada como anteriormente.

5.3. Ação da pepsina sobre a atividade inibitória da F-Sephadex

A ação da pepsina sobre a atividade inibitória da F-Se

phadex foi estudada incubando-se 5,0 ml de uma solução contendo 0,2 mg/ml (em ácido fórmico 0,1M, pH 2,4), em tubos de ensaio a 37°C, por 5 horas. Decorrido este tempo, era feita a adição de ácido tricloroacético 100%, até uma concentração final de 2,5%. O material era centrifugado por vinte minutos a 16.500 x g, após o que era feito ensaio para determinar a atividade inibitória residual.

5.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (pH 8,1)

As eletroforeses em gel de poliacrilamida a pH 8,1, foram feitos de acordo com a técnica de Clarke (10). Todos os experimentos foram efetuados à temperatura ambiente (25-28°C) com voltagem constante (200 V).

A detecção de inibidores de tripsina foi feita de acordo com as técnicas descritas por Uriel e Berges (38) e Kaiser e Belitz (18), procedendo-se da seguinte maneira: após experimento os cilindros de gel foram retirados dos tubos de vidro e incubados a 37°C por 30 minutos com uma solução de tripsina bovina (0,1 mg/ml em tampão fosfato 0,1M, pH 7,6). Decorrido este tempo, os cilindros foram lavados seis vezes com água destilada e em seguida reincubados a 37°C, por mais 30 minutos e em seguida imersos em uma mistura de APNE (2,5 mg/ml em dimetilformamida) com uma solução de O-dianisidina tetrazotizada (0,55 mg/ml em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4) na proporção de 1:9. Passados 30 minutos os cilindros foram lavados com ácido acético 7%.

5.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

As eletroforeses em gel de poliacrilamida com SDS 1%, foram feitas segundo a técnica de Weber e Osborn (47). As diferentes preparações foram dissolvidas em tampão fosfato 0,01M, pH 7,6 contendo SDS 2%. A eletroforese foi desenvolvi

da com corrente constante e igual a 7mA por coluna de gel, durante cerca de 4 horas.

A detecção de proteína foi feita imergindo os cilindros de gel em uma solução de Coomassie Blue 0,005% por 15 horas. Em seguida os cilindros foram transferidos para uma solução de ácido acético 7%.

A visualização dos inibidores de tripsina e determinação dos pesos moleculares, foram efetuadas utilizando-se a técnica de Xavier-Filho e Moreira (43).

5.6. Eletrofocalização em placas de gel de poliacrilamida

Nos experimentos de eletrofocalização foi utilizado essencialmente o método de Awdeh e col. (4), adaptado por Xavier-Filho e Sousa (45). As placas de gel foram preparadas utilizando-se água destilada, solução de acrilamida 30% contendo bisacrilamida 1%, mistura de anfólitos (pH 3 a 6 40%) e persulfato de amônio (10 mg/ml), na proporção de 80:30:3:7 (v:v:v:v). Esta solução foi aplicada entre duas placas de vidro (12 x 9 cm), espaçadas por fitas elásticas de 0,5 mm de espessura e mantidas em posição por outras duas fitas elásticas. Após polimerização, uma das placas foi retirada, ficando o gel preso à outra placa. As amostras foram então aplicadas no lado do catodo e a focalização desenvolveu-se durante quatro horas, numa câmara úmida. A voltagem máxima utilizada foi de 100 volts, e o experimento desenvolvido até a corrente ter alcançado um mínimo de cerca de 0,5 mA. Uma tira longitudinal de 0,5 cm de largura foi retirada e cortada em secções de 0,5 cm de comprimento e postas a eluir em água destilada por 16 horas. O pH correspondente a cada secção foi então medido para a determinação do gradiente. A visualização dos inibidores de tripsina baseou-se no processo de coramento negativo descrito por Uriel e Berges (38) e adaptado por Xavier-Filho e Sousa (45). Após visualização a secagem da placa foi iniciada

adicionando-se algumas gôtas de glicerina à solução descoran
te de ácido acético 7%; após meia hora a placa era transfери
da para uma folha de papel de filtro 3MM úmida e posta para
secar em um secador de gel apropriado por uma hora. Decorrido
este tempo o gel, completamente seco, estava aderido à folha
de papel de filtro e era assim conservada.

III - RESULTADOS

1. Extração de proteína e inibidores de eixo e cotilédones

As Figuras 1 e 2 mostram os rendimentos, em unidades de inibidor (UI) e miligrama de proteína por grama de material original, de extrações sucessivas de farinha de cotilédones e de eixos embrionários. Os resultados mostram que praticamente a totalidade da atividade inibitória e da proteína solúvel é extraída nas duas primeiras etapas.

Diante desses resultados, os Extratos Brutos de cotilédones usados para a purificação parcial dos inibidores, foram obtidos pela mistura dos sobrenadantes das duas primeiras etapas de extração.

2. Distribuição de inibidores de tripsina nas sementes

A distribuição de inibidores em eixo, cotilédones e tegumento foi observada quando se determinou a atividade anti-tríptica de Extratos Brutos de farinha dessas partes, utilizando o método de medida da atividade da tripsina tendo BAPA como substrato. Os resultados estão mostrados na Tabela I.

3. Distribuição dos inibidores de tripsina em cotilédones

A possibilidade da existência de um gradiente de inibidores de tripsina nos cotilédones de C. brasiliensis Mart., foi investigada. Os cotilédones foram divididos em secções proximal, mediana e distal. Os extratos destas secções foram preparados conforme descrito em Materiais e Métodos e suas atividades inibitórias contra tripsina bovina, determinadas através do método de medida da atividade BAPAásica da Tripsina. Os resultados estão resumidos na Tabela II.

Figura 01 - Rendimento de extrações sucessivas de atividade anti-trípica de farinha de cotilédones (A) e de eixo (B) de Canavalia brasiliensis Mart.

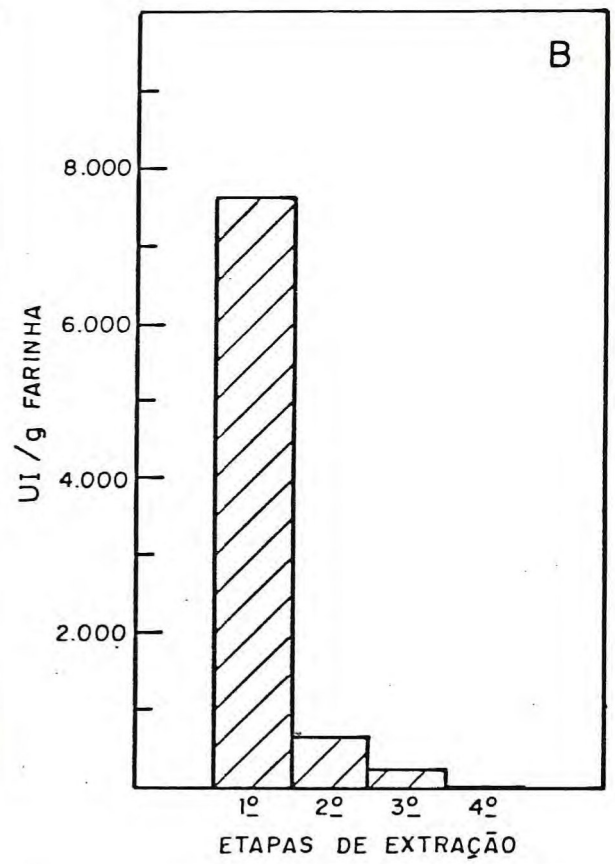
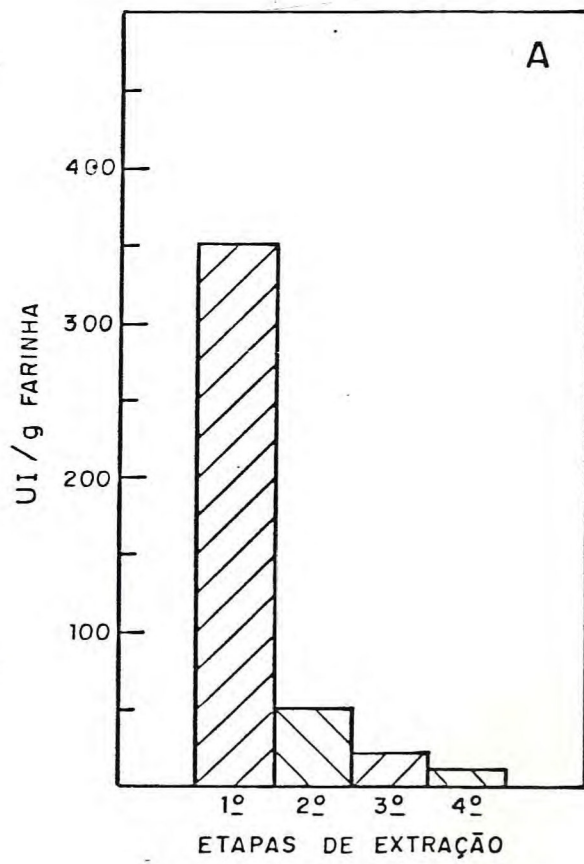


Figura 2 - Rendimento de extrações sucessivas de proteína de
farinha de cotilédones (A) e de eixo (B) de
Canavalia brasilensis Art.

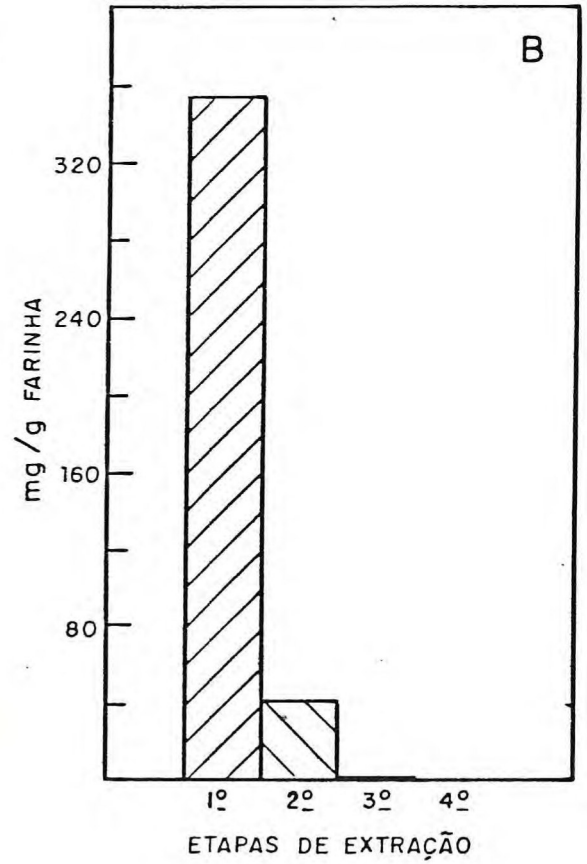
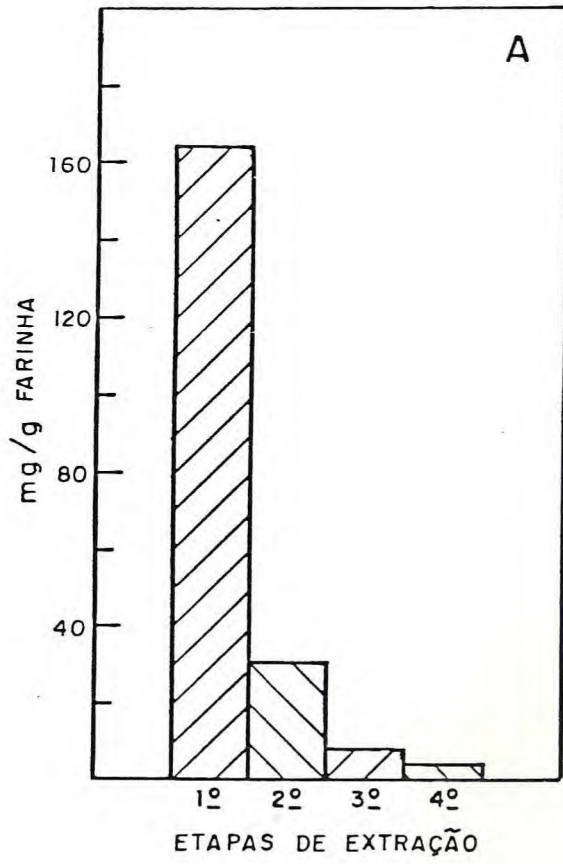


Tabela I - Distribuição da atividade anti-tríptica em sementes de C. brasiliensis Mart.

Órgão	UI/ g farinha
Cotilédones	410
Eixo	8.420
Tegumento	Não detectado

Tabela II - Distribuição da atividade anti-tríptica em cotilédones de C. brasiliensis Mart.

Secção	UI/g farinha
Proximal	410
Mediana	410
Distal	410

4. Distribuição das atividades inibitórias entre as frações albumínicas e globulínicas de eixo e cotilédones

A Tabela III mostra a distribuição da atividade anti-trípica e de proteína entre as frações albumínicas e globulínicas de cotilédones e eixo embrionário de C. brasiliensis Mart. É evidente que os inibidores de tripsina acompanham nitidamente as albuminas, havendo, no entanto, uma contaminação substancial das globulinas, resultado, pròvavelmente, de coprecipitação.

5. Purificação parcial dos inibidores de tripsina de cotilédones

Os inibidores de tripsina de cotilédones, foram parcialmente purificados a partir da F-Albumina, que tem ca. de 17 vezes maior atividade específica que a fração globulínica (Tabela III). Após liofilização da F-Albumina, esta foi fracionada em uma coluna de Sephadex G-100. As frações contendo atividade inibitória (Fig. 3) foram reunidas, dialisadas por 24 horas contra água destilada, liofilizadas (F-Sephadex) e posteriormente aplicadas a uma coluna de Sepharose-4B-anidro-tripsina (Fig. 4); a fração retida na coluna e eluída com HCl 0,1 M-NaCl 0,3M, pH 2,0, foi dialisada por 24 horas contra água destilada, liofilizada (F-Sepharose) e armazenada a -17°C até o seu uso.

A Tabela IV mostra que o esquema de purificação utilizado proporcionou uma purificação de ca. de 99 vezes com um rendimento de 35%.

6. Caracterização parcial dos inibidores de tripsina de cotilédones

6.1. Espectro de absorção

Tabela III - Distribuição da atividade inibitória contra tripsina entre as frações albumínicas e globulínicas de eixo e cotilédones de C. brasiliensis Mart.

Órgão	Extrato Bruto			Albuminas			Globulinas		
	I (1)	P (2)	A.E. (3)	I (1)	P (2)	A.E. (3)	I (1)	P (2)	A.E. (3)
Eixo	8.400	320	26,2	6.940	40	173,5	624	160	3,9
Cotilédones	410	160	2,6	210	9	23,3	164	120	1,4

(1) - I= Atividade inibitória, expressa em UI/g farinha

(2) - P= Proteína, expressa em mg/ g farinha

(3) - A.E.= Atividade específica

Figura 3 - Padrão de eluição de inibidores (—o—o—) e prote
na (—●—●—●—) da F-Albumina de cotilédones de Can
valia brasiliensis Mart., em coluna de Sephadex G
100 a pH 7,6

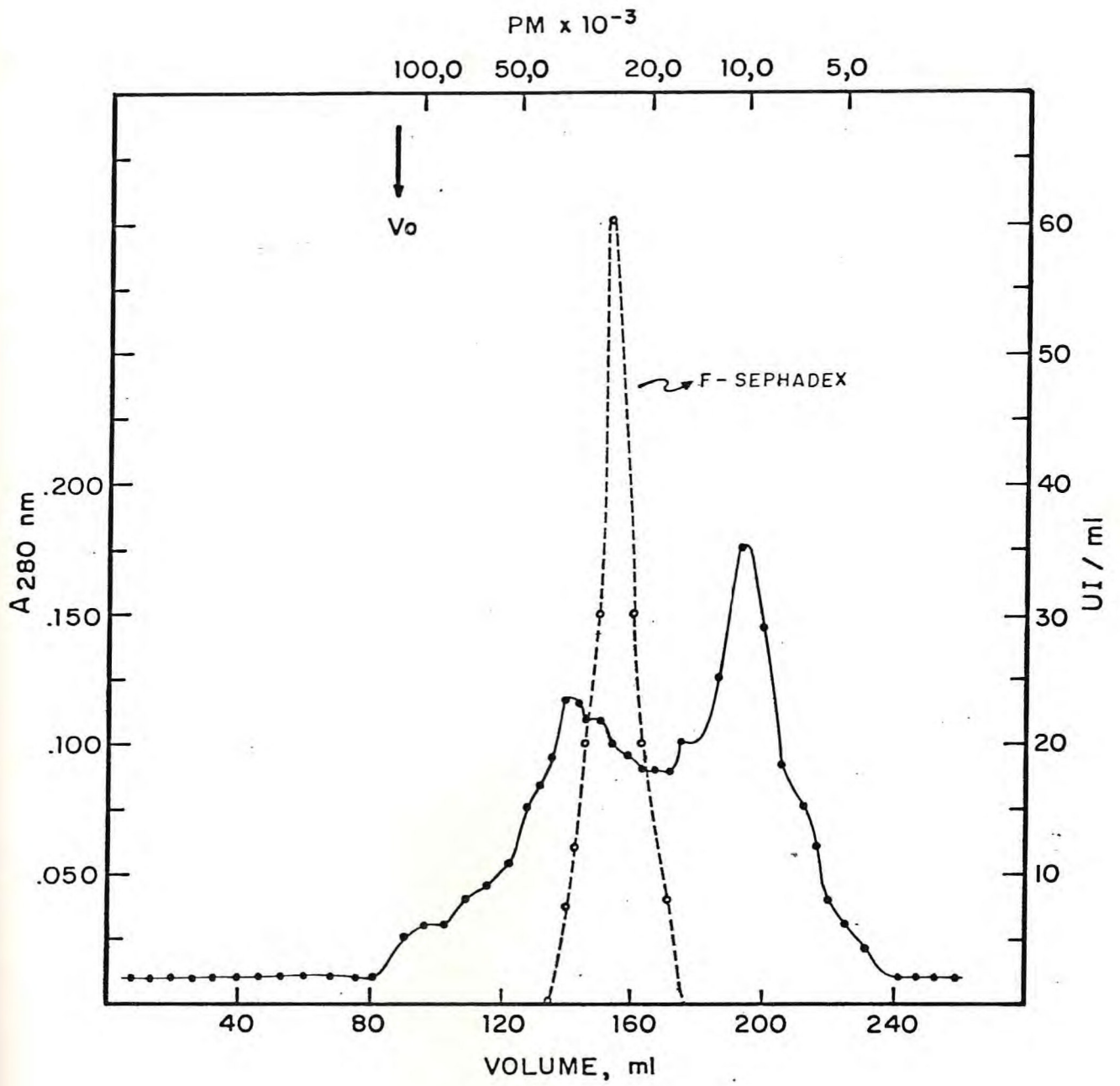


Figura 4 - Cromatografia de afinidade da F-Sephadex em coluna de Sepharose-4B-anidro-tripsina equilibrada a pH 7,6. A_{280} (—●—●—●—●—); atividade anti-trípica (—○—○—).

ERRATA

O gráfico correspondente à Figura 4, é aquele constante da página 41.

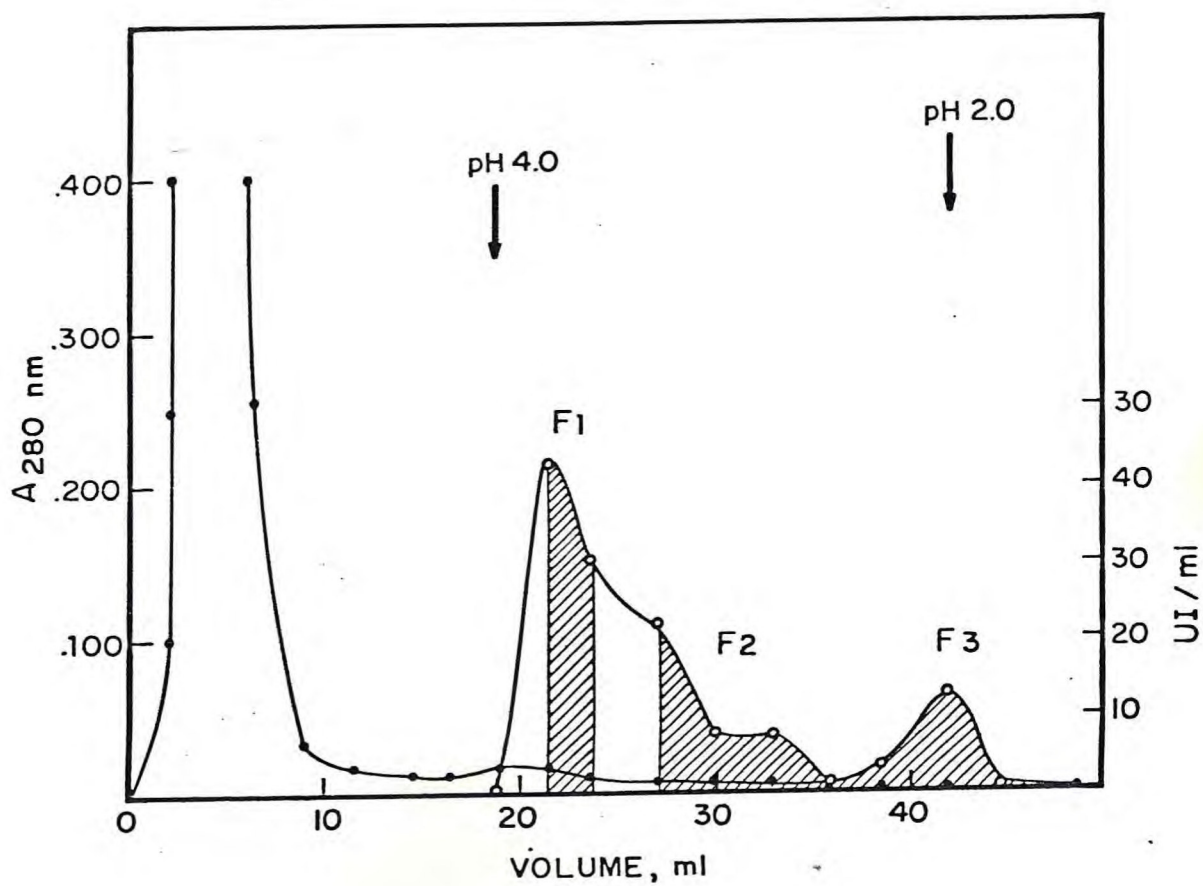


Tabela IV - Tabela de purificação de inibidores de tripsina de cotilédones de C. Brasiliensis Mart.

Preparação	Inibidor (1)	Proteína (2)	Ativ.Esp. (3)	Purificação (x)	Recuperação (%)
Extrato Bruto	410	190	2,1	1,0	100
F-Albumina	206	10,8	19,1	9,1	50
F-Sephadex	153	2,7	56,7	27,0	37
F-Sepharose	142	0,68	208,8	99,0	35

(1) - Expresso em UI/g farinha

(2) - Expressa em mg/g farinha

(3) - Expressa em UI/mg de proteína

Os espectros de absorção da F-Albumina e das frações com atividade inibitória obtidas pelo fracionamento por filtração em gel (F-Sephadex) e cromatografia de afinidade (F-Sepharose), estão mostrados na Figura 5. Estes espectros foram determinados em soluções contendo 1,0, 1,0 e 0,93 mg/ml, respectivamente, em tampão fosfato 0,1M, pH 7,6.

6.2. Ação do calor sobre a atividade inibitória da F-Sephadex

O efeito do calor sobre a atividade anti-tríptica presente no material retido na coluna de exclusão molecular, foi investigado em soluções preparadas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,6 e em ácido fórmico 0,1M, pH 2,4. Após incubação das soluções por 30 minutos nas diferentes temperaturas, a atividade inibitória residual das soluções tratadas, foi medida pela inibição da hidrólise de BAPA por tripsina. Os resultados estão mostrados na Figura 6.

6.3. Ação da pepsina sobre a atividade inibitória da F-Sephadex

O efeito da pepsina sobre a atividade anti-tríptica da fração rica em inibidores de tripsina e separada por cromatografia de exclusão molecular (F-Sephadex), foi investigada em soluções preparadas em ácido fórmico 0,1M, pH 2,4. A atividade anti-tríptica residual de cada um dos tratamentos (Tabela V) foi determinada pela inibição da atividade BAPAásica da tripsina.

6.4. Reação com tripsina bovina e tripsina porcina

A ação dos inibidores presentes na F-Albumina sobre tripsina bovina e tripsina porcina foi estudada, utilizando

Figura 5 - Espectro de absorção da F-Albumina (1,0 mg/ml
(—●—●—●—●—), F-Sephadex (1,0 mg/ml) (—○—○—○—)
F-Sepharose (0,93 mg/ml) (—▲—▲—▲—). O solvent
utilizado foi tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6.

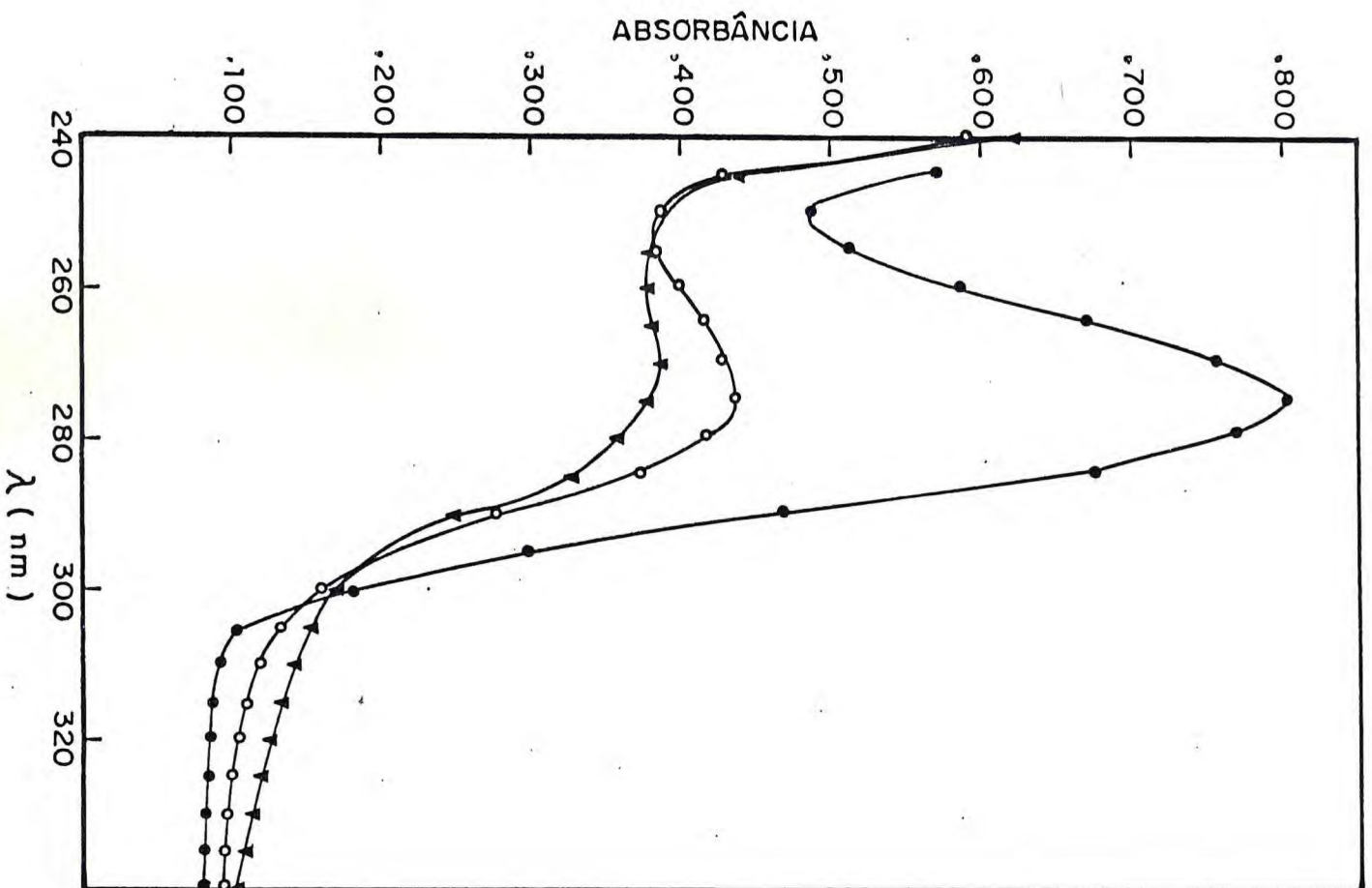


Figura 6 - Efeito do calor sobre a atividade anti-trípica d
F-Sephadex . pH 7,6 (—●—●—●); pH 2,4 (—○—○—○).

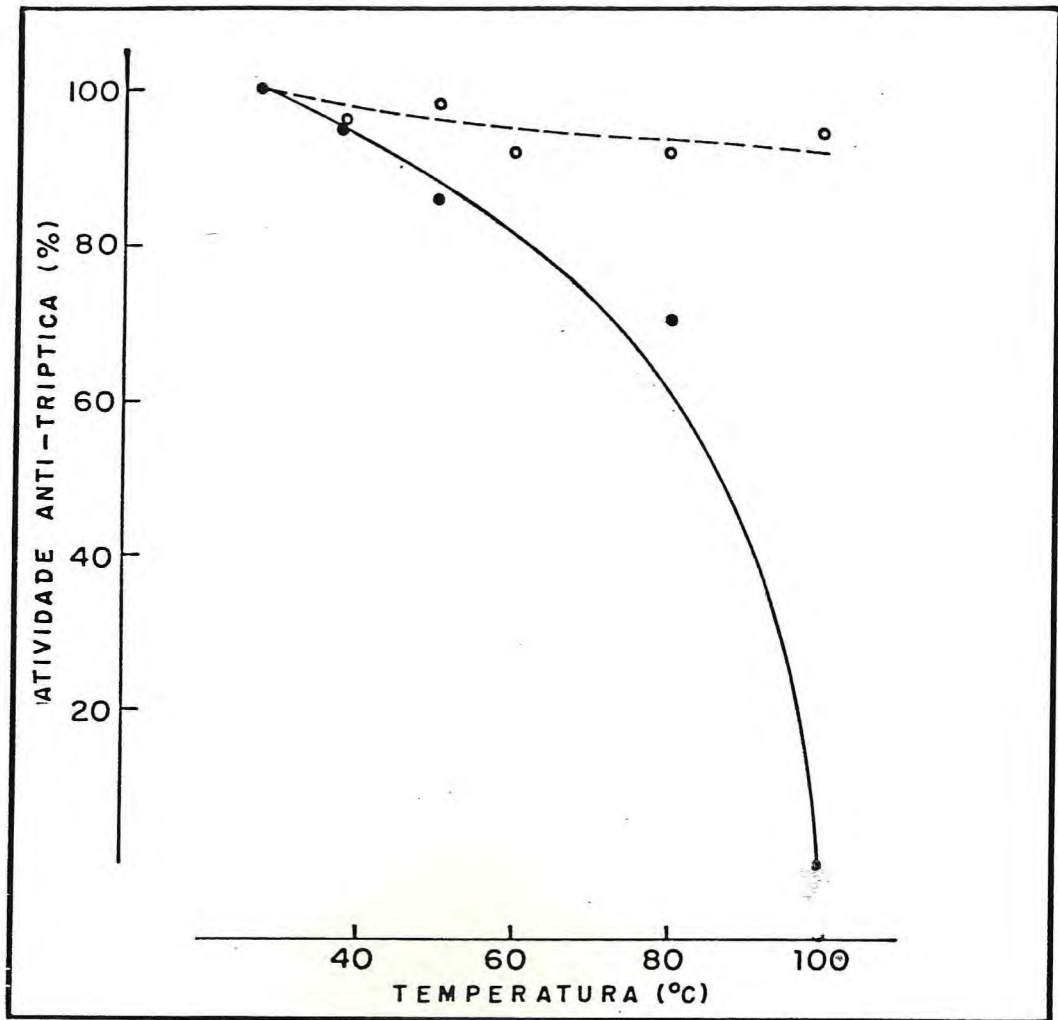


Tabela V - Ação da pepsina sobre a atividade anti-tríptica da F-Sephadex

Tubo	F-Sephadex (1) (ml)	Ácido fórmico (ml)	Pepsina (ml)	Atividade residual (%)
1	5,0	0,0	1,0	65,0
2	5,0	1,0	0,0	100,0
3	0,0	5,0	1,0	-

(1) - 0,2 mg/ml em ácido fórmico 0,1 M, pH 2,4

do-se BAPA como substrato. As soluções de tripsina porcina e tripsina bovina utilizadas nos ensaios, preparadas em HCl 0,0025N, foram tituladas com NPGb (9), determinando-se assim a concentração de tripsina ativa em cada uma das soluções, bem como um fator que, multiplicado pela absorbância a 410 nm das soluções de ensaio de atividade anti-trípica tendo BAPA como substrato, dá a quantidade, em peso, de tripsina ativa na solução de ensaio.

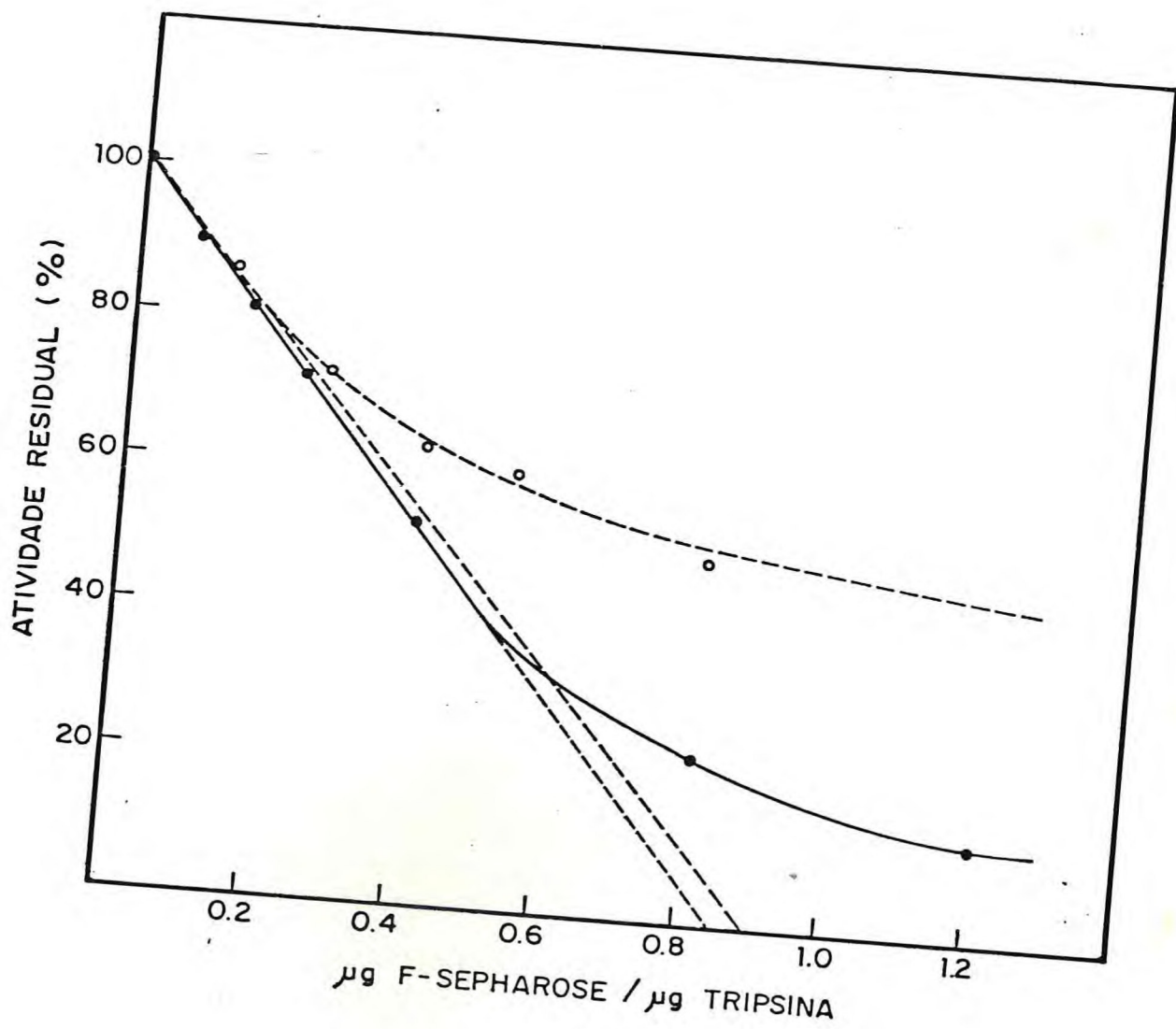
Tomando-se um peso molecular de 23.800 daltons para ambas as tripsinas e um coeficiente de extinção molar de 16.595 para o NPGb (9), a percentagem de tripsina ativa nas soluções de tripsina bovina e tripsina porcina utilizadas foi de 39,0 e 78,4, respectivamente.

Para o cálculo do fator utilizado na transformação dos resultados das leituras de densidade ótica dos ensaios de atividade BAPAásica da tripsina em concentração de tripsina ativa, foram feitos ensaios de atividade BAPAásica das soluções de tripsina bovina e tripsina porcina usados nos experimentos de titulação, diluídas em HCl 0,0025N até 91,1 μ g/ml e 32,0 g/ml, respectivamente. Os valores dos fatores foram de 18,48 g/D.O. para tripsina bovina e 7,17 g/D.O. para tripsina porcina.

6.5. Estequiometria da reação inibidor-tripsina

A estequiometria da reação inibidor-tripsina foi determinada em função da atividade residual da enzima após a reação com a F-Sepharose. Com a razão de combinação enzima/inibidor, obtida a partir da porção linear da curva, foi calculado um peso molecular, admitindo-se que as espécies presentes tenham todas a mesma massa molecular (admitindo-se uma estequiometria 1:1) e um peso molecular de 23.800 daltons para a tripsina. Essa determinação foi feita através do ensaio de atividade BAPAásica e caseinolítica da tripsina bovina (Fig. 7).

Figura 7 - Ação da F-Sepharose sobre tripsina bovina, medida
pela hidrólise de BAPA (—●—●—●—) e caseína
(—○—○—○—).



O pêsso molecular obtido foi de 20.500 daltons e 21.500 daltons, quando empregados os ensaios de atividade BAPAásica e caseinolítica da tripsina, respectivamente.

O cálculo da concentração de tripsina ativa no ensaio caseinolítico foi possível em virtude de se ter usado a mesma solução estoque usada no ensaio com o BAPA. Como mostrado no parágrafo 6.4., a partir do valor da leitura de densidade ótica do ensaio de atividade BAPAásica a quantidade de tripsina ativa é calculada multiplicando-se este valor por 18,48. Assim, como a solução de tripsina utilizada no ensaio de atividade caseinolítica foi uma diluição da mesma solução utilizada no ensaio de atividade BAPAásica, cuja concentração já era conhecida, pôde-se relacionar o valor de densidade ótica no ensaio caseinolítico com a concentração de tripsina.

Estes experimentos permitiram também avaliar uma constante de dissociação (17) do complexo entre tripsina bovina e os inibidores presentes na F-Sepharose. O valor encontrado foi da ordem de 10^{-8} M e foi calculado a partir da porção não linear de ambas as curvas (Fig. 7), utilizando a fórmula:

$$K_i = \frac{(E)(I)}{(EI)}, \text{ onde:}$$

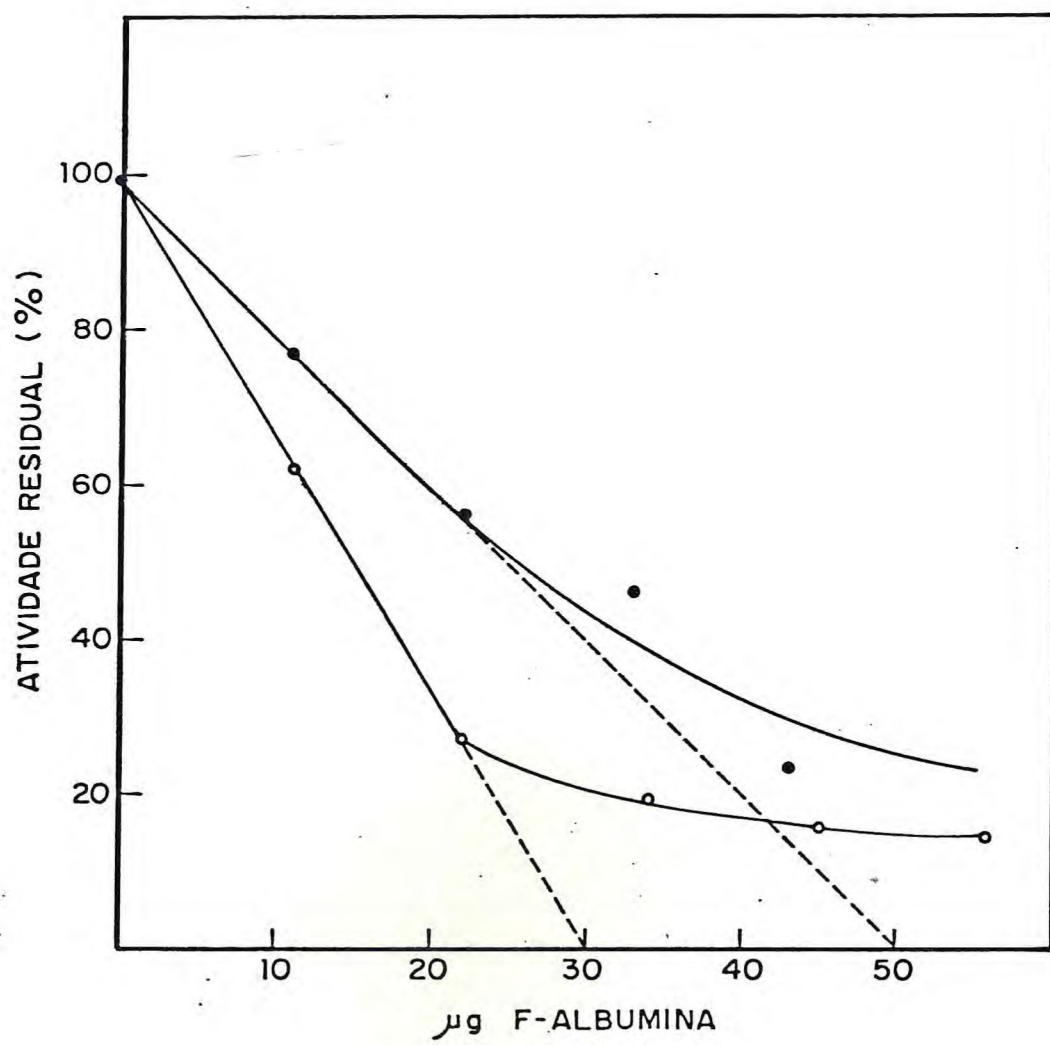
(EI) = concentração molar do complexo enzima-inibidor;

(I) = concentração molar do inibidor livre;

(E) = concentração molar de tripsina livre.

A ação dos inibidores de C. brasiliensis sôbre tripsina porcina foi examinada quando se comparou a razão de combinação da enzima com a F-Albumina. A Figura 8 mostra a inibição de tripsina bovina e de tripsina porcina pela F-Albumina, onde se vê que tripsina porcina é totalmente inibida por cerca da metade da quantidade de inibidor necessária para abolir a atividade de tripsina bovina.

Figura 8 - Ação da atividade inibitória da F-Albumina sobre tripsina bovina (—●—●—) e sobre tripsina porcina (—○—○—).



6.6. Pontos isoelétricos

Parte da atividade inibitória retida na coluna da Sepharose-4B-anidro-tripsina pode ser eluída com tampão acetato 0,1M-NaCl 0,3M, pH 4,0 e parte com HCl 0,1M-NaCl 0,3M, pH 2,0. Os eluatos foram separados em três frações, F_1 , F_2 e F_3 (Fig. 9) e examinados por eletrofocalização em placa. Foi detectada a presença em cada uma delas a presença de duas frações com atividade inibitória (Fig. 10) com pontos isoelétricos 4,35 e 4,50. Por outro lado, eletrofocalização da fração retida na coluna e eluída como um todo com HCl 0,1M-NaCl 0,3 M, pH 2,0 (F-Sepharose), indicou a presença de atividades inibitórias com pontos isoelétricos 4,35, 4,50, 4,65, 4,85 e 5,35 (Fig. 11). Tal resultado também foi obtido quando se examinou a F-Albumina e a F-Sephadex (Fig. 11). Em todos os casos, há predominância quantitativa das atividades inibitórias de pontos isoelétricos 4,35 e 4,50.

6.7. Pêso molecular

O pêso molecular dos inibidores foi determinado por filtração em gel (Sephadex G-100), por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e a partir da estequiometria da reação dos inibidores com tripsina (Fig. 7).

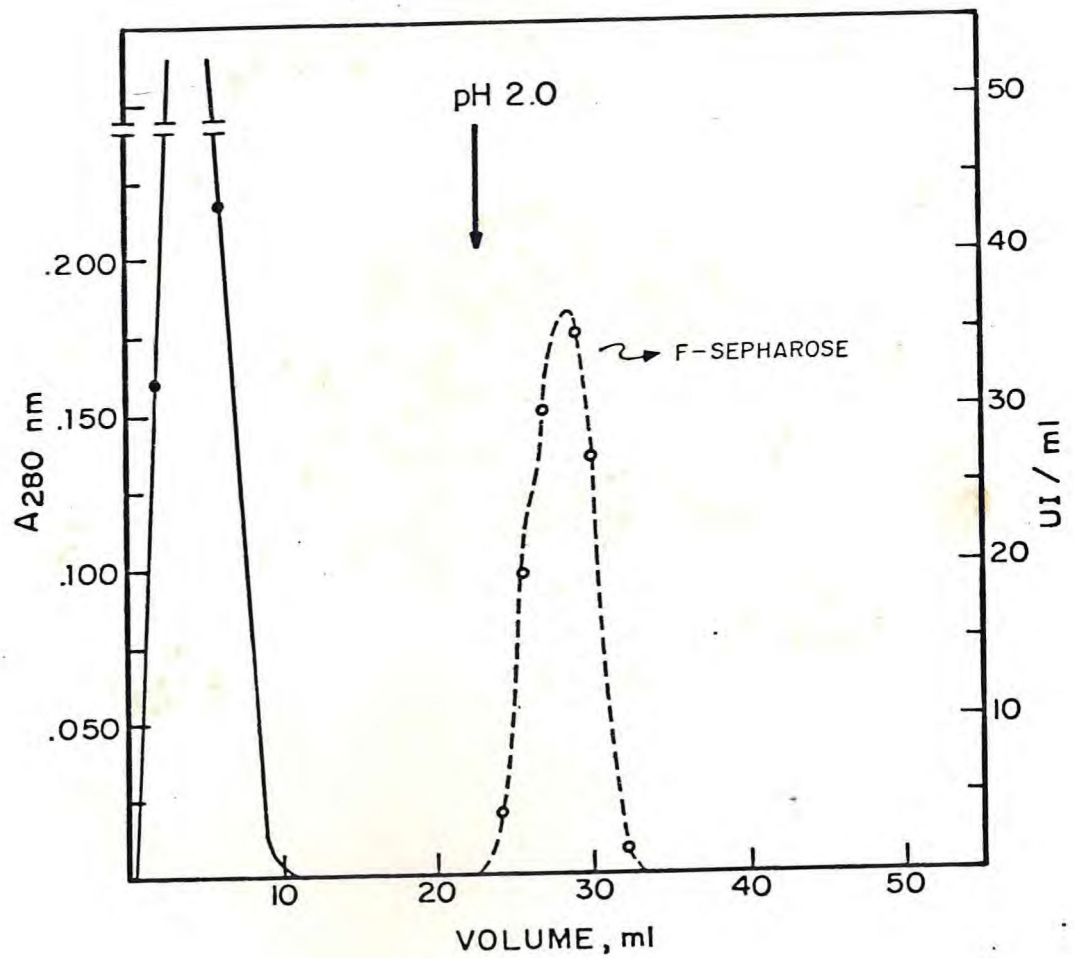
Nos experimentos de filtração em gel a pH 7,6 do Extrato Bruto (Fig. 12), F-Albumina (Fig. 3) e F-Sepharose (Fig. 13), a atividade inibitória foi eluída num volume equivalente a um pêso molecular de aproximadamente 25.000 daltons. O mesmo valor foi obtido quando a eluição foi feita em pH 2,4 (Figs. 14 e 15), indicando que os inibidores não se associam ou, sendo sistemas associantes, a dissociação não ocorre a pH ácido.

Por eletroforese em gel de poli(acrilamida com SDS as preparações de Extrato Bruto, F-Albumina, F-Sephadex e F-Sepharose, apresentaram uma única banda de inibidor, equivalente a um pêso molecular de 11.500 daltons (Fig. 16). Na Fig

Figura 9 - Cromatografia de afinidade da F-Sephadex em coluna de Sepharose-4B-anidro-tripsina equilibrada a pH 7,6. A_{280} (—●—●—); atividade anti-tríptica (—○—○—).

ERRATA

O gráfico correspondente à Figura 9, é aquele constante da página 30.



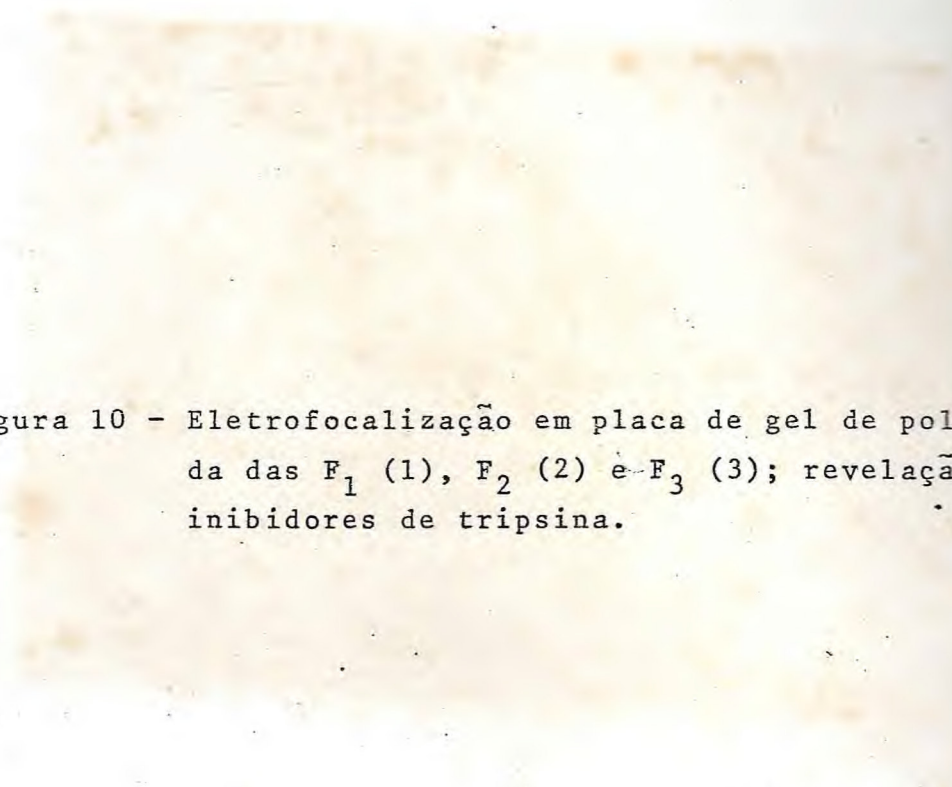


Figura 10 - Eletrofocalização em placa de gel de poliacrilamida das F_1 (1), F_2 (2) e F_3 (3); revelação para inibidores de tripsina.

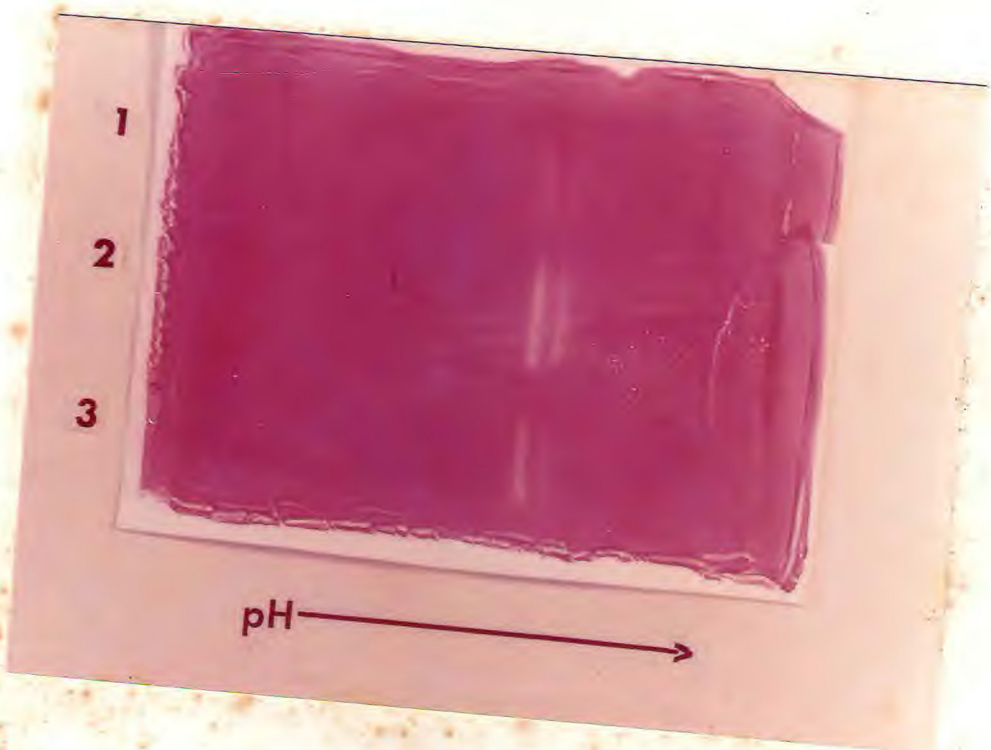


Figura 11 - Eletrofocalização em placa de gel de poliacrilamida do Extrato Bruto (1), F-Albumina (2), F-Sephadex e F-Sepharose (4); revelação para inibidores de tripsina.

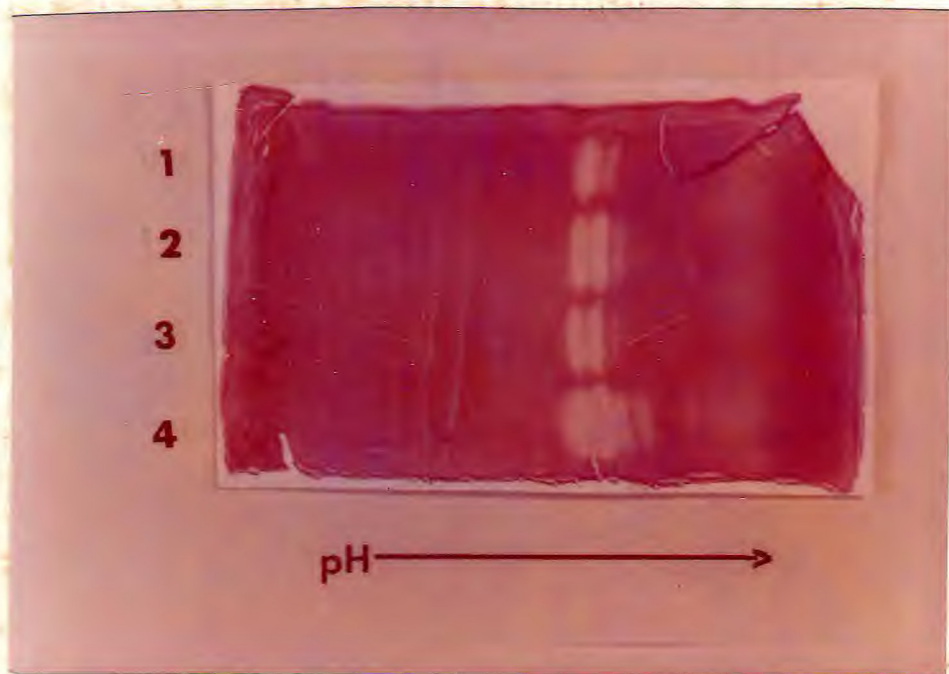


Figura 12 - Padrão de eluição de proteína (—●—●—) e inibidores (—○—○—) de Extrato Bruto de cotilédones de Canavalia brasiliensis Mart., em coluna de Sephadex G-100, a pH 7,6.

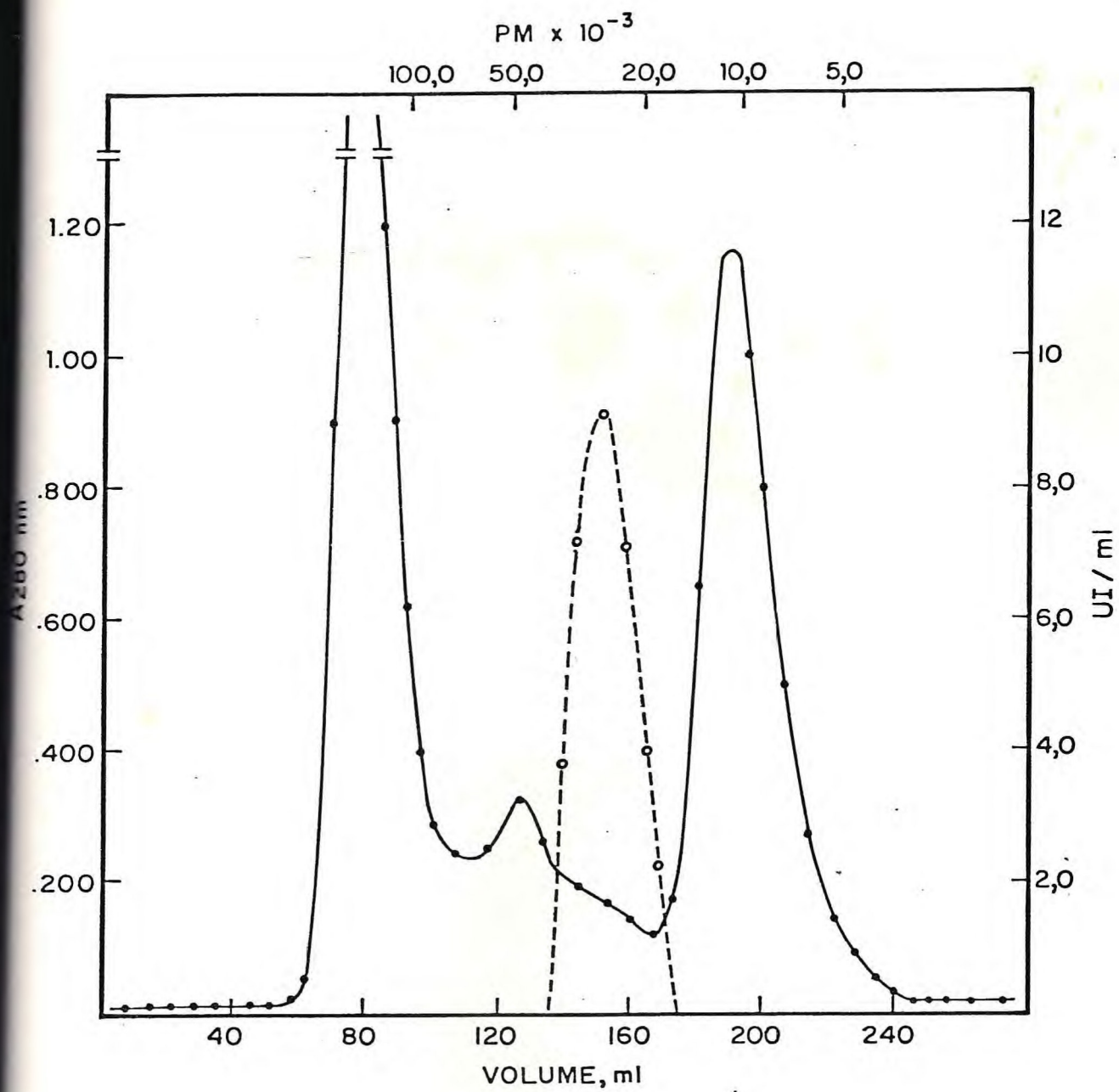


Figura 13 - Padrão de eluição de inibidores (—○—○—) e proteína (—●—●—) fa F-Sepharose, em coluna de Sephadex G-100, a pH 7,6.

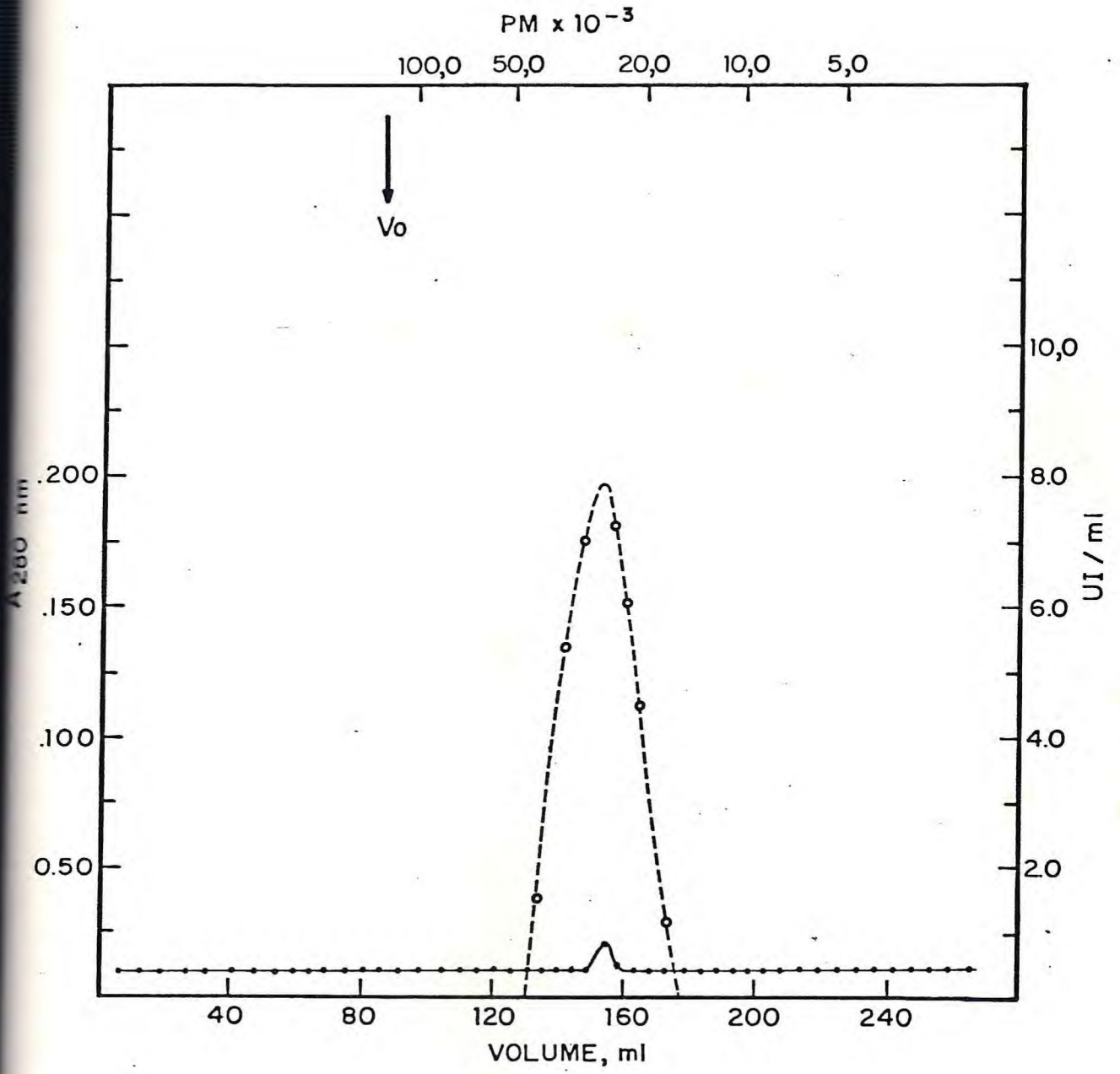


Figura 14 - Padrão de eluição de proteína (—●—●—●) e inibidores (—○—○—○) da F-Albumina de cotilédones de Canavalia brasiliensis Mart., em coluna de Sephadex G-100, a pH 2,4.

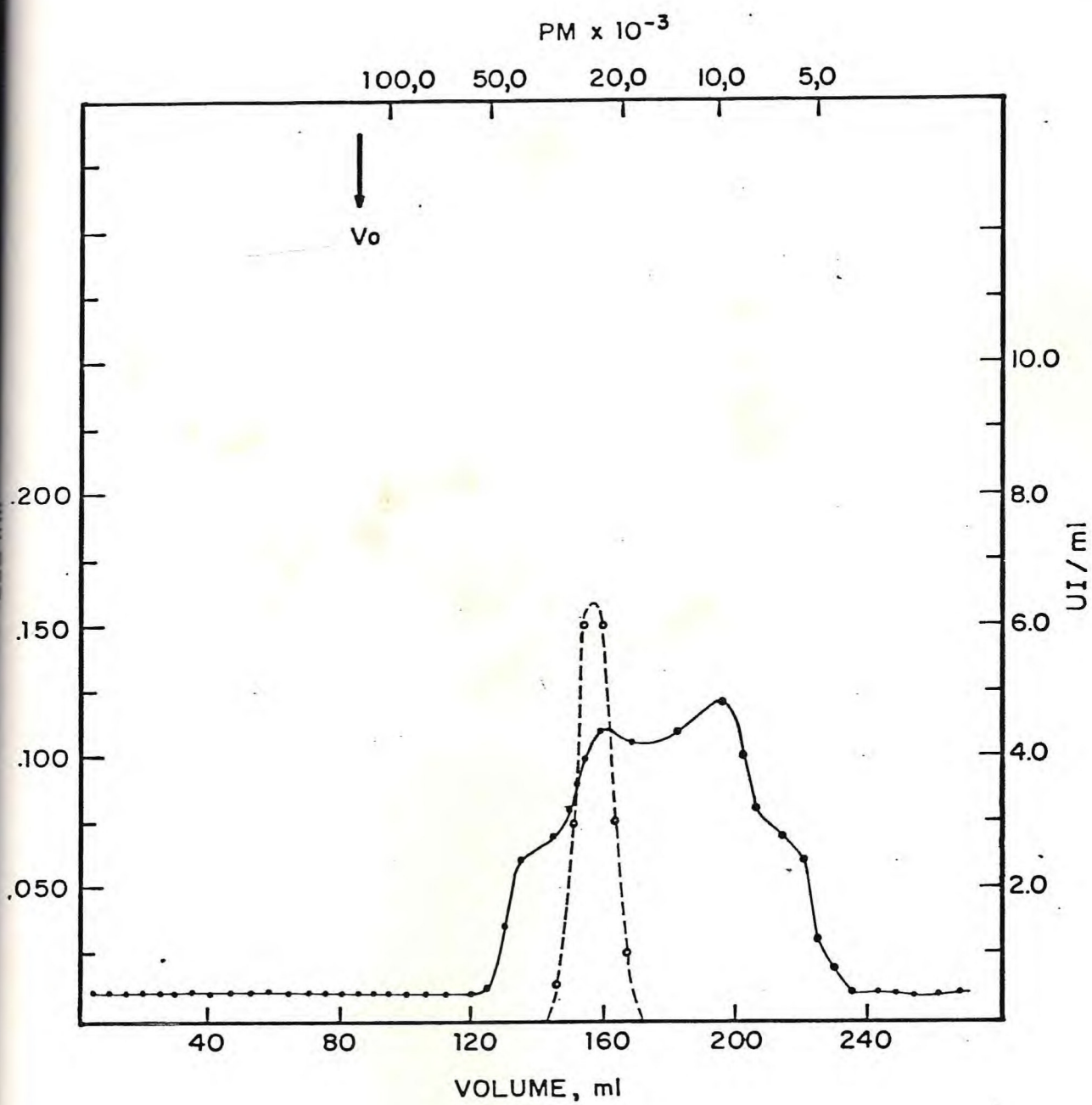


Figura 15 - Padrão de eluição de proteína (—●—●—●—) e inibidores (—○—○—) da F-Sepharose, em coluna de Sephadex G-100, a pH 2,4

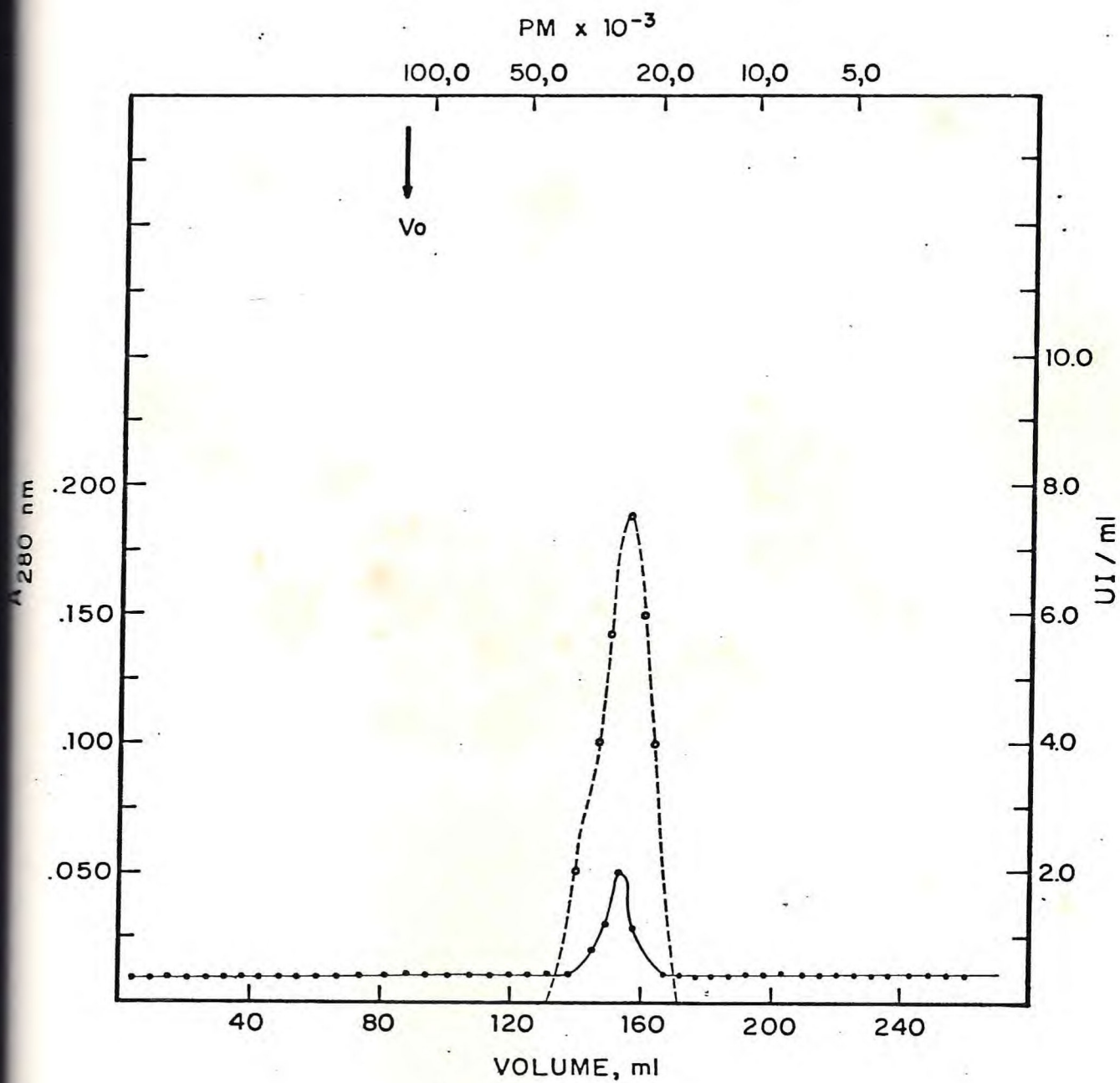
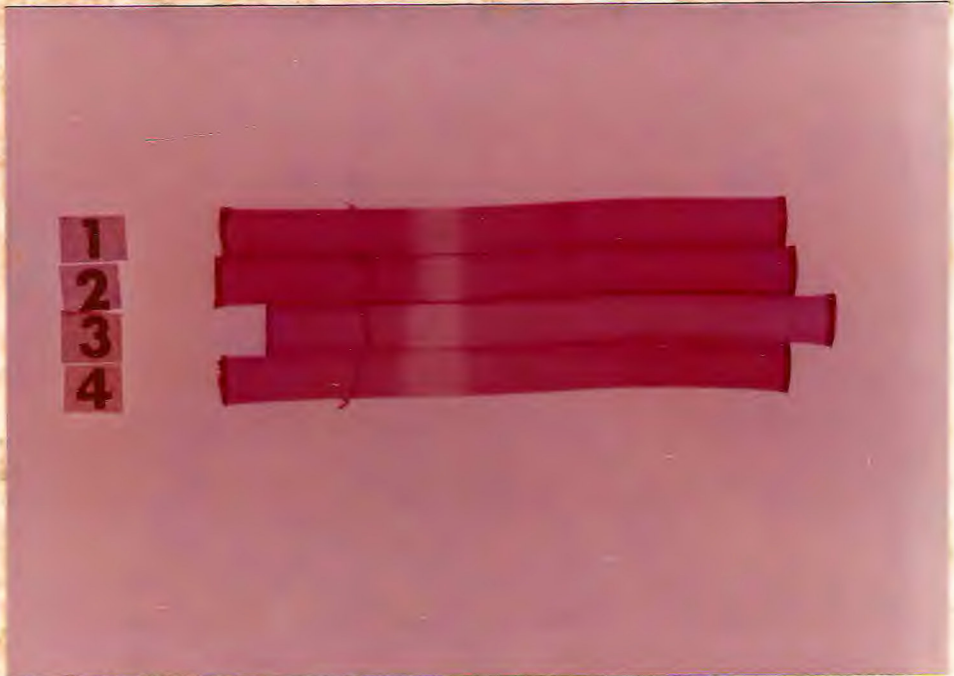


Figura 16 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS do Ex
trato Bruto (1), F-Albumina (2), F-Sephadex (3) e
F-Sepharose (4); revelaçãõ para inibidores de trip
sina.



ra 17 estão mostrados os resultados de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS quando os cilindros de gel foram corados para proteína. Na eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,1, também foi obtida uma única banda com atividade inibitória em todas as preparações, com um Rf de 1,0 (Fig. 18).



Figura 17 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS do Ex
trato Bruto (1), F-Albumina (2), F- Sephadex (3) e
F-Sepharose (4); revelação para proteína.

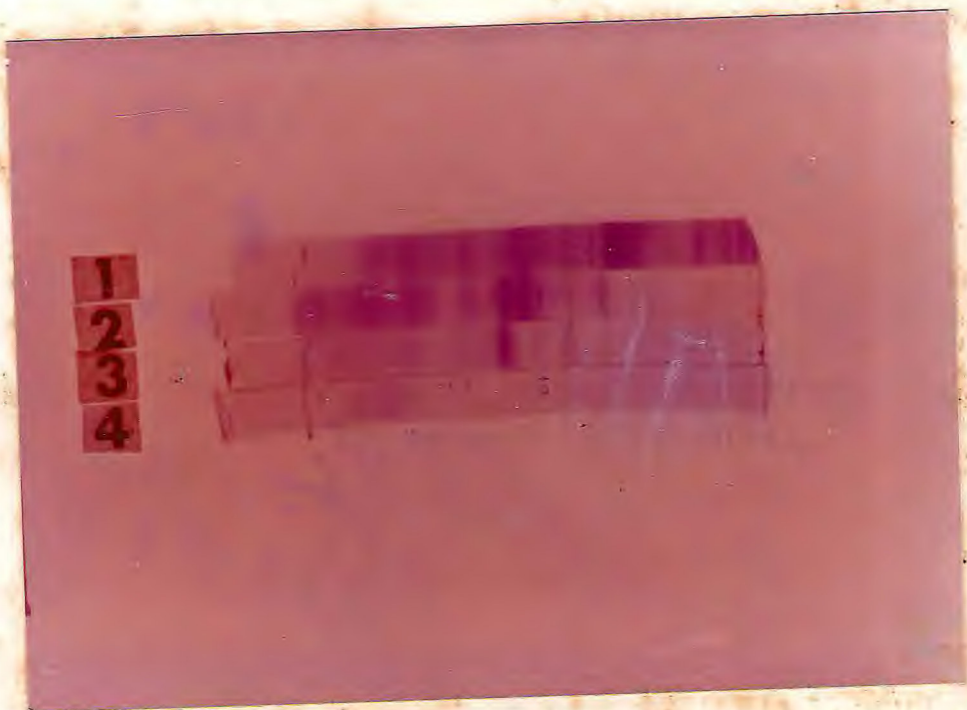
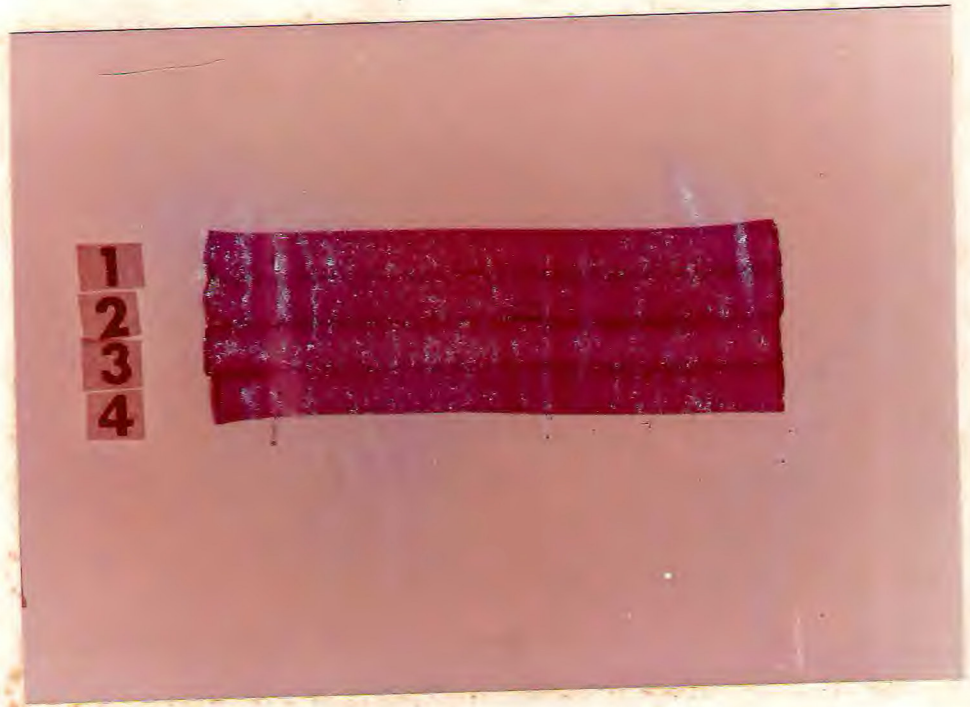


Figura 18 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,1 do Extrato Bruto (1), F-Albumina (2), F-Sephadex (3) e F-Sepharose (4); revelação para inibidores de tripsina.



IV - DISCUSSÃO

Os inibidores de tripsina em sementes de Canavalia brasiliensis estão localizados no eixo embrionário e cotilédones, inexistindo no tegumento (Tabela I). Sua concentração no eixo embrionário é ca. de vinte vezes maior que nos cotilédones (Tabela III) e são extraídos juntamente com as proteínas de caráter albumínico (Tabela III). Embora apenas 51% da atividade inibitória nos cotilédones estejam presentes na fração albumínica e 40% na fração globulínica, a atividade específica na primeira é 17 vezes maior que na segunda. O caráter albumínico desses inibidores e o fato de que sua presença na fração globulínica seja devido a fenômenos de co-precipitação, são sugeridos pela análise dos resultados obtidos nos experimentos de filtração em gel, eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,1, eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e eletrofocalização em placa (Figs. 03 e 12 a 18). Comportamento semelhante é demonstrado por alguns outros inibidores de tripsina isolados de vegetais, como por exemplo, os inibidores de tripsina de Vigna unguiculata, isolados por Royer e col. (29).

Os métodos de isolamento empregados neste trabalho, levaram a uma purificação de 99 vezes da atividade anti-trípica, em relação ao Extrato Bruto, obtendo-se uma recuperação de 35% (Tabela IV). O fracionamento do Extrato Bruto por diálise, embora levando a uma perda de 40% da atividade inibitória para as globulinas, tem a vantagem de ser um método suave, não submetendo os inibidores a choques químicos que pudessem alterar suas propriedades. Este fracionamento, mostra a grande estabilidade desses inibidores em soluções aquosas, a temperaturas relativamente altas (89°C), pois o tempo total de diálise sendo de 96 horas, apenas 10% da atividade inibitória total são perdidas (Tabela III).

A análise da fração com atividade inibitória, obtida ao final da purificação, mostrou ser a mesma homogênea em relação a peso molecular (Figs. 13 e 16) e mobilidade eletroforética (Fig. 18). Apesar de haver dois grupos de inibidores que são eluídos a pH 4,0 e um grupo eluído a pH 2,0 na coluna de Sepharose-4B-anidro-tripsina, eles parecem ser compostos dos mesmos tipos de inibidores (Fig. 10). O fato de parte dos inibidores serem eluídos a pH 4,0, pode ser explicado à luz da hipótese que formulamos nos próximos parágrafos e que postula que os inibidores estão associados sob a forma de dímeros. Ao se dissociarem, um dos inibidores teria seu sítio reativo inacessível à tripsina, de modo que o agregado dimérico formaria complexos com uma única molécula de enzima. Assim, ao eluir a coluna com tampão de pH 4,0 ocorreria um deslocamento no sentido do monômero (que seria facilitado em virtude do complexo dímero-tripsina estar não mais em solução e sim ligado a uma matriz sólida) que seria favorecido pelo abaixamento do pH, acarretando então dissociação de parte do agregado dimérico e afetando apenas parcialmente e de forma inespecífica a ligação dos inibidores à tripsina.

Apesar de nas frações F_1 , F_2 e F_3 terem sido detectados apenas os inibidores de pontos isoelétricos 4,35 e 4,50, quando a eletrofocalização era feita com material proveniente de cromatografias onde a coluna era eluída somente com HCl 0,1M-NaCl 0,3M, pH 2,0, são detectados cinco inibidores com pontos isoelétricos 4,35, 4,50, 4,65, 4,85 e 5,35, os mesmos detectados no Extrato Bruto, F-Albumina, F-Sephadex (Figs. 12, 3 e 13). Estes resultados sugerem que, embora nos cotilédones de C. brasiliensis Mart., exista uma multiplicidade de inibidores de tripsina, eles possuem muitas propriedades químicas em comum.

Em relação aos resultados obtidos nos experimentos de eletrofocalização (Fig. 11), é importante observar que eles mostram que os métodos de isolamento utilizados não criaram formas artificiais de inibidores, uma vez que as mesmas atividades inibitórias são detectadas em todas as etapas de purificação. A ausência da atividade inibitória de ponto isoelétrico 5,35 no Extrato Bruto, provavelmente deve-se à baixa concentração desse inibidor.

O espectro de absorção dos inibidores é típico de moléculas com pequena quantidade de aminoácidos aromáticos, como é o caso dos inibidores de tripsina de origem vegetal. A Figura 5 mostra que à medida em que a purificação da atividade inibitória aumenta, ocorre um deslocamento do máximo de absorção de 275 nm para comprimentos de onda menores. A atividade inibitória parcialmente purificada tem, na região do ultravioleta, um máximo de absorção a 270 nm e um mínimo a 255 nm. Resultados semelhantes foram obtidos com inibidores de tripsina de sementes de Vigna unguiculata (45) e Dolichos lablab (15).

O tratamento dos inibidores (F-Albumina) pelo calor, em meio ácido, mostrou que a atividade inibitória é estável. Mesmo após um tratamento de 30 minutos a 100°C, a atividade não foi praticamente afetada. Em meio alcalino, no entanto, a atividade inibitória é gradualmente abolida, à medida que a temperatura se eleva. Esta resistência ao calor, indicativa de uma estrutura terciária rígida, estabilizada provavelmente por pontes S-S, também é compartilhada pelos inibidores de tripsina de Anacardium occidentale (42), Phaseolus angularis (46), e parece ser uma propriedade comum à maior parte dos inibidores de tripsina (28).

Quando os inibidores (F-Albumina) foram tratados com pepsina a pH 2,4 por 5 horas, em torno de 35% da atividade

inibitória foi abolida (Tabela V), indicando que os inibidores de tripsina de C. brasiliensis Mart., são, em certa extensão, resistentes ao ataque de enzimas proteolíticas. Resultados semelhantes foram obtidos por Xavier-Filho e Ainouz (42) e Toshiro e Maki (37), com a atividade inibitória de sementes de caju e arroz, respectivamente.

Os inibidores de tripsina presentes na F-Albumina, inibem mais fortemente tripsina porcina que tripsina bovina (Fig. 8). O conhecimento da especificidade de um dado inibidor frente aos diferentes tipos de enzimas proteolíticas, tem sido objeto de investigação (13, 14), uma vez que os estudos sobre a possibilidade do uso de uma semente ou planta particular como complementação da ração protéica para animais, têm que responder à questão básica que é a de saber se os inibidores presentes nas plantas estudadas de fato inibem a atividade das enzimas proteolíticas dos animais que se alimentarão da ração (23). Os resultados aqui obtidos mostram a importância dessa questão, uma vez que tripsina porcina, filogeneticamente bastante próxima de tripsina bovina, é inibida com uma potência aproximadamente duas vêzes maior que a tripsina bovina e indicam a necessidade de estudos de especificidade frente a um número mais diversificado de enzimas proteolíticas.

Os valores para a constante de dissociação do complexo enzima-inibidor foram da ordem de $2-3 \times 10^{-8}$ M (Fig. 7), nos ensaios onde caseína e BAPA foram utilizados como substratos. Estes valores são da mesma ordem de grandeza de outros complexos entre inibidores de origem vegetal e as enzimas tripsina e quimiotripsina (20). A forma da curva de inibição, quando BAPA é utilizado como substrato de tripsina é diferente da forma da curva quando o substrato para tripsina é caseína, sugerindo neste caso, um efeito do substrato sobre a dissociação do complexo enzima-inibidor. Este maior efeito

sobre a dissociação do complexo, observado com o substrato protéico não está de acordo com as afinidades relativas de BAPA ($10^{-2}M$) e caseína ($10^{-5}M$) para a enzima.

Através de experimentos de filtração em gel a pH 7,6 (Figs. 12, 3 e 13) e a pH 2,4 (Figs. 14 e 15) foi calculado um peso molecular de 25.00 daltons para a atividade inibitória. Em sementes de Vigna unguiculata, Xavier-Filho e Sousa (45) isolaram e caracterizaram um inibidor de tripsina que se associava a pH básico, desfazendo-se a associação em pH ácido. O peso molecular obtido a partir da estequiometria da reação da atividade inibitória contra tripsina bovina, utilizando caseína e BAPA como substrato foi 20.500 e 21.500 daltons, respectivamente. Estes dois resultados sugerem que os inibidores de Canavalia brasiliensis Mart., aparentemente não se associam. O peso molecular obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, 11.500 daltons (Fig. 16), sugere no entanto que na realidade esses inibidores se associam, provavelmente como dímeros, sendo a associação bastante forte, não podendo ser desfeita em meio ácido, pelo menos em solução.

V - CONCLUSÕES

Os inibidores de tripsina, parcialmente purificados e caracterizados, presentes em cotilédones de Canavalia brasiliensis Mart., apresentam as seguintes características:

1. Nas sementes, a atividade inibitória está localizada nos cotilédones e no eixo embrionário. Nos cotilédones, ela está uniformemente distribuída por todo o órgão.
2. Existem pelo menos cinco tipos de inibidores com pontos isoelétricos de 4,35, 4,50, 4,65, 4,85 e 5,35, apresentando caráter albumínico, com um máximo de absorção a 270 nm e com um peso molecular de aproximadamente 11.500 daltons.
3. Os inibidores responsáveis pela atividade inibitória fazem parte de um sistema associante que parece ser do tipo dímero-monômero, não sendo dependente do pH.
4. A atividade é estável ao calor em meio ácido e instável em meio alcalino, sendo parcialmente resistente à hidrólise por enzimas proteolíticas em meio ácido.
5. Uma constante de dissociação média da ordem de grandeza de 10^{-8} M foi calculada para o complexo entre tripsina e os inibidores.
6. A atividade é aproximadamente duas vezes maior contra tripsina porcina do que contra tripsina bovina.

VI - BIBLIOGRAFIA

1. Ako, H., Ryan, C.A. and Foster, R.J. 1972. The purification by affinity chromatography of a proteinase inhibitor binding species of anhydro-chymotrypsin. Biochem. Biophys. Res. Comm. 46 (4), 1639-1645.
2. Ako, H., Foster, R.J. and Ryan, C.A. 1972. The preparation of anhydrotrypsin and its reactivity with naturally occurring proteinase inhibitors. Biochem. Biophys. Res. Comm. 47 (6), 1402-1407.
3. Ako, H., Foster, R.J. and Ryan, C.A. 1974. Mechanism of action of naturally occurring proteinase inhibitors studies with anhydrotrypsin and anhydrochymotrypsin purified by affinity chromatography. Biochemistry 13 (1), 132-139.
4. Awdeh, Z.L. Williamson, A.R. and Askonas, B.A. 1968. Isoelectric focusing polyacrylamide gels and its application to immunoglobulins. Nature, 219, 66-67.
5. Bezerra, P. 1980. Comunicação pessoal.
6. Birk, Y. 1974. Structure-activity relationships of several trypsin and chymotrypsin inhibitors from legumes seeds. In: Bayer Symposium V - Proteinase Inhibitors. Ed. by H. Fritz, L.J. Greene and E. Truscheit, Springer Verlag, Berlin and New York.
7. Blow, D., Janin, J., and Swett, R.M. 1974. Mode of action of soybean trypsin inhibitor (Kunitz) as a model for specific protein-protein interactions. Nature, 249 (5422), 54-57.
8. Cavada, B.S. e Moreira, R.A. 1979. Lectinas de sementes de feijão de boi (Canavalia brasiliensis Mart.). XXXI Reunião da SBPC, Fortaleza, Ceará. Livro de Resumos.
9. Chase, T. and Shaw, E. 1970. Titration of trypsin, plasmin and thrombin with p-nitrophenyl p'-guanidinobenzoate.HCl. In: Methods in Enzimology, 19, 20-27. Ed. by S.P. Colowick and N.O. Kaplan, Academic Press, New York.

10. Clarke, J.T. 1964. A simplified "disc" (polyacrylamide gel) electrophoresis. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 428-436.
11. Determann, H. and Michel, W. 1966. The correlation between molecular weight and elution behaviour in the gel chromatography of proteins. J. Chromatog., 25, 303-313.
12. Erlanger, B.F., Nicholas, K. and Williams, C. 1961. The preparation and properties of two new chromogenin substrates of trypsin. Arch. Biochem. Biophys., 95, 271-278.
13. Feeney, R.E., Means, G.E. and Bigler, J.C. 1969. Inhibition of human trypsin, plasmin and thrombin by naturally occurring inhibitors of proteolytic enzymes. J. Biol. Chem., 244 (8), 1957-1960.
14. Figarella, C., Negri, G.A. and Guy, D. 1974. Studies on inhibition of the two human trypsins. In: Bayer Symposium V - Proteinase Inhibitors. Ed. by H. Fritz, J.L. Greene and E. Truscheit, Springer Verlag, Berlin and New York.
15. Furusawa, Y., Kurosawa, Y., Chuman, I. 1974. Purification and properties of trypsin inhibitor from hakuhenzu bean (Dolichos lablab). Agric. Biol. Chem., 38 (6), 1157-1164.
16. Goa, J. 1953. A microbiuret method for protein determination of total protein in cerebrospinal fluid. Scand.J. Clin. Lab. Invest., 5, 218-222.
17. Green, N.M. and Work, E. 1953. Pancreatic trypsin inhibitors (I), preparation and properties, (II) reaction with trypsin. Biochem. J. 54, 347-353.
18. Kaiser, K.P. and Belitz, H.D. 1971. Proteinaseinhibitoren in lebensmitteln. Vorkommen und Isolierung von trypsin und chymotrypsininhibitoren in kaintoffeln. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebens., 1, 1-7.
19. Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. J. Gen. Physiol., 30, 291-310.
20. Laskowski, M. Jr., and Sealock, R.W. 1971. Protein proteinase inhibitors - molecular aspects. In: The Enzymes. Ed. by P.D. Boyer, 3rd. ed., vol. 3, pp. 375-437. Academic Press New York.

21. Liener, I. 1962. Toxic factors in edible legumes and their elimination. Amer. J. Clin. Nutr., 11, 281-289.
22. Liener, I. 1976. Legume toxins in relation to protein digestibility - A review. J. Food Science, 14, 1076-1081.
23. Liener. 1979. Significance for humans of biologically active factors in soybeans and other food legumes. J. Am. Oil Chemists' Soc., 56, 121-129.
24. Liener, I. and Kakade, M. L. 1969. Protease inhibitors. In: Toxic constituents of plant foodstuffs. Ed. by I.E. Liener pp 7-68, Academic Press, New York.
25. Lowry, O.H. and Rosebrough, M.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275
26. Ozawa, K., Laskowski, M. Jr. 1966. Reactive site of trypsin inhibitors. J. Biol. Chem., 241 (17), 3455-3461.
27. Puzstai, A. 1967. Trypsin inhibitors of plant origin, their chemistry and potential role in animal nutrition. Nutrit. Abstracts and Reviews, 37 (11), 1-9.
28. Richardson, M. 1977. The proteinase inhibitors of plants and microorganisms. Phytochemistry, 16, 159-169.
29. Royer, A., Miège, M.N., Grange, A., Miège, J. et Mascherpa, J.M. 1974. Inhibiteurs anti-trypsine et activités protéolitiques des albumines de graine de Vigna unguiculata. Planta (Berl.), 119, 1-6.
30. Ryan, C.A. 1973. Proteolytic enzymes and their inhibitors. Ann. Rev. Plant Physiol., 24, 173-196.
31. Ryan, C.A. 1978. Proteinase inhibitors in plant leaves: A biochemical model for pest-induced natural plant protection. Trends in Biochem. Sci., 3, 148-150.
32. Ryan, C.A. and Balls, P.A. 1962. An inhibitor of chymotrypsin from Solanum tuberosum and its behaviour toward trypsin. Proc. Nat. Acad. Sci., Washington, 48 (110), 1839-1843.

33. Ryan, D.S. and Feeney, R.E. 1974. The inhibition of catalytically inactive proteolytic enzyme with proteinase inhibitor methyl-chymotrypsin. In: Bayer Symposium V - Proteinase inhibitors. Ed. by H. Fritz, J.L. Greene and E. Truscheit, pp 378-383, Springer Verlag, Berlin and New York.
34. Sephadex-gel filtration in theory and practice. 1968 . Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Sweden.
35. Siffert, O., Emod, I. and Keil, B. 1976. Interactions of clostripain with natural trypsin inhibitors and its affinity labelling by N-p-nitrobenzyloxycarbonyl arginine chloromethyl ketone. FEBS Letters, 68 (1), 114-119.
36. Swett, R.M., Wright, H.T., Janin, J., Chottia, C.H. and Blow, D.M. 1974. Cristal structure of the complex of porcine trypsin with soybean trypsin inhibitor (Kunitz) at 2,6 A resolution. Biochemistry, 13 (20), 4212-4229.
37. Tashiro, M. and Maki, Z. 1978. Partial purification and some properties of a trypsin inhibitor from rice bran. Agric. Biol. Chem., 42 (6), 1119-1124.
38. Uriel, J. and Berger, J. 1968. Characterization of natural inhibitors of trypsin and chymotrypsin by electrophoresis in acrylamide-agarose gels. Nature, 218, 578-580.
39. Xavier-Filho, J. 1973. Trypsin inhibitors during germination of Vigna sinensis seeds. Physiol. Plant. 28, 149-154.
40. Xavier-Filho, J. 1974. Trypsin inhibitors in sorghum grain. J. Food Sci., 39, 422-423.
41. Xavier-Filho, J. 1979. Relatório ao Deutscher Akademischer Austauschdienst.
42. Xavier-Filho, J. and Ainouz, I.L. 1977. Proteinase inhibitors in meal of Anacardium occidentale seeds. Biol. Plant . (Praha), 19 (3), 183-189.

43. Xavier-Filho, J. and Moreira, R.A. 1978. Visualization of proteinase inhibitors in SDS-polyacrylamide gels. Anal. Biochem., 84, 296-303.
44. Xavier-Filho, J. and Negreiros, A.N.M., 1974. Distribution of proteinase inhibitors in Vigna sinensis seeds. Z. Pflanzenphysiol. Bd., 95 (5), 423-430.
45. Xavier-Filho and Sousa, F.D.N. 1979. Isolation and characterization of a trypsin inhibitor from Vigna sinensis seeds. Biol. Plant. (Praha), 21 (2), 119-126.
46. Warsy, A.S., Norton, G. and Stein, M. 1974. Protease inhibitors from broad beans. Isolation and purification. Phytochemistry, 13, 2481-2486.
47. Weber, K. and Osborn, M. 1964. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 244, 4406-4412.
48. Yoshikawa, M., Ogura, S. and Tatsum, M. 1977. Some properties of proteinase inhibitors from adzuki beans (Phaseolus angularis). Agric. Biol. Chem., 41, 2235-2239.

VII - COMUNICAÇÕES A CONGRESSOS

G 13

PURIFICAÇÃO DE INIBIDORES DE TRIPSINA POR MEIO DE SEPHAROSE-4B-ANIDRO TRIPSINA

JOSÉ XAVIER-FILHO & F.A. DE PAIVA CAMPOS

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, C. Postal 1065, Fortaleza, Ceará

A purificação de inibidores de tripsina por meio de técnicas de afinidade utilizando-se enzima ativa (T) como ligante leva a obtenção de inibidores nos quais a cisão da ligação peptídica do centro ativo ocorre com frequência criando formas artificiais de inibidores; perdas consideráveis podem ocorrer se os inibidores são susceptíveis a proteólise mais extensa (Fritz et al., In H. Fritz e H. Tscheche, Eds. Proc. II Intern. Res. Conference on Proteinase Inhibitors, Walter de Gruyter, Berlin, 1971, p 28).

Anidro-tripsina (AN-T), espécie obtida por tratamento alcalino de ferilmetilsulfonil-tripsina não tem atividade catalítica mas forma complexos estáveis com inibidores (Ako et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 47:1402, 1972).

Utilizando uma coluna de AN-T ligada a Sepharose-4B conseguimos reter, quantitativamente o inibidor de soja e frações semipurificadas de inibidores de Vigna unguiculata e de Canavalia brasiliensis. PAGE-SDS e focalização isoeétrica em placas de gel de poliacrilamida mostram que os inibidores de tripsina de V. unguiculata separados por Sepharose-4B-AN-T tem, aparentemente, os mesmos pontos isoeletricos e pesos moleculares que os nativos. Os inibidores separados por Sepharose-4B-T apresentam as mesmas propriedades sugerindo alterações na estrutura primária não detectadas por estas duas técnicas (M.A. Ruchel - Dissertação de Mestrado, UFC, 1979).

Trabalho realizado com auxílios de DAAD, CNPq e CAPES

IX Reunião Anual da SBBq, Livro de Resumos G 13, 1980