

INIBIDORES DE TRIPSINA EM ADENANTHERA PAVONINA, L.

GERUZA MARIA CALDAS MAIA

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

1982

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

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

Geruza Maria Caldas Maia

DISSERTAÇÃO APROVADA POR:

José Xavier Filho
Orientador da Dissertação

Data

Renato de Azevedo Moreira

Data

Maria da Guia Silva Lima

Data

Ao meu marido, Eider
Ao meu filho, Gustavo Adolpho
Aos meus pais, Odemar e Laura
Aos meus irmãos Alfredo, João
e Odemar Jr.

AGRADECIMENTOS

Ao professor José Xavier Filho, pela orientação segura, estimulante e criteriosa durante a elaboração deste trabalho, o meu sincero e profundo agradecimento.

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

À professora Iracema Lima Ainouz, pela dedicação e carinho que sempre demonstrou ao apresentar sua colaboração precisa e de imenso valor para que este trabalho fosse realizado.

Ao professor Joseph Francis Carasco pelas sugestões apresentadas.

Aos demais professores, colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelos ensinamentos recebidos, ambiente de trabalho, cooperação e amizade.

À Universidade Federal do Rio Grande do Norte, que através do PICD, permitiu o meu afastamento a fim de que este trabalho fosse concretizado.

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

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

Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, através de bolsa de Pós-Graduação.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de convênio com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

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

Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), através de convênio com o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará (Projeto de pesquisa de sementes).

ÍNDICE GERAL

	página
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xi
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	xiv
SUMÁRIO	xii
I. INTRODUÇÃO	1
II. MATERIAIS E MÉTODOS	12
A. MATERIAIS	12
B. MÉTODOS	13
1. Descrição da planta	13
2. Preparação de azo-caseína	13
3. Preparação de solução de azo-caseína a 1,5%	15
4. Preparação da farinha de sementes	15
5. Purificação parcial dos inibidores	15
6. Precipitação com sulfato de amônio	16
7. Atividade da tripsina utilizando azo-ca- seína como substrato	17
a) Escolha da concentração ótima de azo- -caseína	17
b) Espectro de absorção dos produtos de hidrólise	18
c) Determinação da atividade triptica ...	18
8. Determinação da atividade antitriptica ..	19
9. Determinação de proteína	19
10. Ação de ácidos sobre a F4060	19
11. Preparação da farinha de folhas, vagem verde e cotilédones de vagem verde de <i>Adenantha pavonina</i>	20

12. Extração de inibidor na farinha de folhas, vagem verde e cotilédones de vagem verde em <i>Adenanthera pavonina</i>	21
13. Cromatografia de troca iônica	21
14. Cromatografia em SP-Sephadex C 50	22
15. Cromatografia de afinidade em Sepharose 4B-anidro-tripsina	23
15.a) Determinação da capacidade da coluna	23
16. Eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,1	24
17. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS	25
18. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β -mercaptoetanol e uréia 8 M	26
19. Focalização isoelétrica em placas de gel de poliacrilamida	26
III. RESULTADOS	29
1. Atividade da tripsina utilizando azo-caseína como substrato	29
1.a. Espectro de absorção dos produtos de reação	29
1.b. Efeito da concentração de azo-caseína	
1.c. Atividade triptica	29
2. Atividade antitriptica	33
3. Purificação parcial dos inibidores	36
4. Precipitação de inibidores por sulfato de amônio	36
5. Ação de ácidos sobre F4060	44
5.a. Ação do ácido tricloroacético	44
5.b. Ação do ácido acético	44
6. Atividade antitriptica e concentração de proteínas em extrato total de folhas, vagem verde e cotilédones de vagem verde	44

	página
7. Cromatografia em DEAE-celulose	48
8. Cromatografia em SP-Sephadex C 50	53
9. Cromatografia em Sepharose 4B-anidro-tripsina .	57
10. Eletrofocalização em placa de gel de poliacrila- mida	57
11. Eletroforese em gel de poliacrilamida	62
11.a. Eletroforese a pH 8,1	62
11.b. Eletroforese com SDS	66
11.c. Eletroforese com SDS e β -mercaptoetanol e com SDS, β -mercaptoetanol mais uréia 8 M.	66
IV. DISCUSSÃO	71
V. CONCLUSÕES	76
VI. BIBLIOGRAFIA	78
VII. COMUNICAÇÃO A CONGRESSO	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		página
1	- Espectro de absorção dos produtos de hidrólise de Azo-C (1,5 mg/ml) por tripsina	30
2	- Curva de atividade triptica sobre a Azo-C ..	31
3	- Curvas de atividade triptica	32
4	- Curvas de atividade antitriptica no extrato total de <i>Adenantha pavonina</i> em tampão fosfato 0,1 M pH 7,6 / NaCl 1%	34
5	- Esquema utilizado para a extração de inibidores de <i>A. pavonina</i>	37
6	- Precipitação de inibidores de <i>A. pavonina</i> com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	41
7	- Esquema para obtenção de inibidores de <i>A. pavonina</i> precipitáveis com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre 40-60% de saturação	42
8	- Cromatografia em DEAE-celulose da F4060	50
9	- Cromatografia preparativa em DEAE-celulose da F4060	52
10	- Cromatografia em SP-Sephadex C 50 da F ₁ oriunda da cromatografia preparativa em DEAE-celulose	54
11	- Cromatografia em SP-Sephadex C 50 da F4060 em tampão acetato 5 mM pH 5,0	55
12	- Cromatografia de afinidade da FSP ₂ em coluna de Sepharose 4B-anidro-tripsina	58

Figura	página
13 - Eletrofocalização em placa de gel de poliacrilamida da FIB, F4060, FDEAE e FSP ₂ ; revelação para inibidores de tripsina	59
14 - Eletrofocalização em placa de gel de poliacrilamida da FIB, F4060, FDEAE e FSP ₂ ; revelação para inibidores de quimiotripsina	60
15 - Eletrofocalização em placa de gel de poliacrilamida da FIB, F4060, FDEAE e FSP ₂ ; revelação para proteínas	61
16 - Eletrofocalização em placa de gel de poliacrilamida da FIB, F4060, FDEAE e FSP ₂ ; revelação para proteínas e posterior tratamento com ácido acético 7%	63
17 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,1	64
18 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,1 para visualização de inibidores de tripsina	65
19 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS da FSP ₂	67
20 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS do pico ativo (F ₂) obtido em coluna de afinidade	68
21 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS da FSP ₂ . Tratamento com β-mercaptoetanol e uréia 8 M.	69

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela		página
I	- Atividade antitriptica em <i>Adenanthera pavonina</i>	35
II	- Extração de inibidores de farinha de <i>A. pavonina</i> utilizando diferentes soluções extratoras	38
III	- Precipitação de inibidores em diferentes níveis de saturação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	39
IV	- Dados obtidos através do processo de precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	40
V	- Tabela de purificação	43
VI	- Dados obtidos quando F4060 é submetida a tratamento com TCA	45
VII	- Dados obtidos quando F4060 é submetida a tratamento com ácido acético	46
VIII	- Especificação das amostras	47
IX	- Atividade antitriptica e concentração de proteínas em extrato total de folhas, vagem verde, cotilédones e tegumento da semente de vagem verde e de semente seca de <i>A. pavonina</i> .	49
X	- Resultados obtidos após cromatografia em DEAE-Celulose	51
XI	- Etapas de purificação do inibidor de <i>A. pavonina</i>	56

SUMÁRIO

Sementes quiescentes, livres de tegumento, de *Adenanthera pavonina*, L. (carolina), foram analisadas quanto ao seu teor de inibidores de tripsina. A extração de inibidores foi efetuada utilizando-se tampão fosfato 0,1M pH 7,6/NaCl 1%. O substrato empregado para detectar a capacidade de inibição contra tripsina foi azo-caseína, cujo espectro de absorção apresentou extinção máxima em 440 nm. Para testar a atividade antitriptica utilizando-se azo-caseína, foi estabelecido através de ensaios de atividade, que a tripsina deveria estar numa concentração de 10 µg/ml e o substrato a 1,5 (p/v) em tampão fosfato 0,1 M pH 7,6 / NaCl 1%.

Os inibidores de tripsina foram isolados de sementes quiescentes de *A. pavonina*, L. por extração com tampão fosfato 0,1 M pH 7,6 / NaCl 1% e parcialmente purificados por precipitação com sulfato de amônio entre 40-60% de saturação, cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade. Suas características foram examinadas por SP-Sephadex C 50, Sepharose 4B-anidro-tripsina, focalização isoelétrica em placa de gel de poliacrilamida, eletroforese em gel de poliacrilamida (pH 8,1, SDS e SDS com β-ME e uréia 8 M).

Foi possível demonstrar a existência de inibidores de tripsina não apenas nas sementes, mas também em outras partes da planta tais como folhas, vagem verde e cotilédones de vagem verde.

A fração de inibidor ativa, isolada por cromatografia em SP-Sephadex C 50 (FSP₂) quando examinada por focalização isoelétrica se apresenta heterogênea, mostrando que a atividade antitriptica de *A. pavonina*, L. é constituída por uma família de 6 inibidores, com pontos isoelétricos entre 4,5 e 5,1. Esta mesma fração, através da eletroforese com

SDS, demonstrou uma única banda de inibidor contra tripsina, equivalente a um peso molecular de, aproximadamente, 19.000 daltons. A fração de inibidor ativa proveniente da cromatografia de afinidade e eluída, em todas as preparações, a pH 4,0 apresentou um peso molecular de, aproximadamente, 20.000 daltons, evidenciado através da eletroforese com SDS.

Esta mesma fração (FSP₂) apresentou também atividade contra quimiotripsina, fato este evidenciado por focalização isoeletrica em placa de gel de poliacrilamida.

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

- APNE - N-acetil-DL-fenilalanina- β -naftil-ester
- ASD - Ácido sulfanílico diazotizado
- Azo-C - Azo-caseína
- β -ME - β -mercaptoetanol
- DEAE-Cel - Dietilaminoetil-celulose
- ET - Extrato total
- FIB - Fração de inibidor bruto obtido por diálise do Extrato total contra água e posterior liofilização
- F 040 - Fração com atividade antitriptica obtida por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre 0-40% de saturação; diálise contra água e liofilização.
- F 4060 - Fração com atividade antitriptica obtida por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre 40-60% de saturação; diálise contra água e liofilização
- F 6080 - Fração com atividade antitriptica obtida por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre 60-80% de saturação; diálise contra água e liofilização
- F 80100 - Fração com atividade antitriptica obtida por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre 80-100% de saturação; diálise contra água e liofilização
- FDEAE - Fração com atividade antitriptica obtida por cromatografia em coluna de DEAE-celulose da F 4060
- F₁ - Primeira fração com atividade antitriptica obtida por eluição da coluna de DEAE-celulose com tampão fosfato 5mM pH 7,0 e gradiente de ácido cítrico 0,01 - 0,2 M

- F₂ - Segunda fração com atividade antitriptica obtida por eluição da coluna de SP-Sephadex C 50 com tampão acetato 5 mM pH 5,0 / NaCl 0-1 M da F₁ oriunda da cromatografia preparativa em DEAE-celulose
- FSP₁ - Fração com atividade antitriptica obtida por cromatografia em coluna de SP-Sephadex C 50 da FDEAE
- FSP₂ - Fração com atividade antitriptica obtida por cromatografia em coluna de SP-Sephadex C 50 da F 4060
- F₂-Sephadex - Segunda fração com atividade antitriptica obtida por eluição da coluna de SP-Sephadex G 50 com tampão acetato 5 mM pH 5,0 / NaCl 0-1 M da F 4060
- F₂-Sepharose - Fração com atividade antitriptica obtida por eluição da coluna de Sepharose 4 B-anidrotripsina com HCl 0,01 M / NaCl 0,3 M em pH 4,0
- IT - Inibidor de tripsina
- P - Proteína
- SDS - Dodecil sulfato de sódio
- TEMED - N, N, N', N' - tetrametilenodiamino
- TCA - Ácido tricloroacético
- TLCK - N- α -p-Tosil-L-lisina-clorometilcetona
- TRIS - 2-amino-2 hidroximetil-1,3-propanodiol (trishidroximetilaminometano)
- TU - Unidades de atividade da tripsina
- UI - Unidades de inibidor
- PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida

I - INTRODUÇÃO

I.1 - Considerações gerais

É fato conhecido que durante a germinação as proteínas de reserva da semente são hidrolisadas por enzimas proteolíticas, a peptídios e aminoácidos. Estes são transportados para outras partes da semente ao longo do desenvolvimento do embrião para serem utilizados na síntese de novas proteínas (1, 2). O conhecimento dessas enzimas proteolíticas é limitado e virtualmente pouco se sabe sobre sua regulação. As proteases de semente estão, freqüentemente, associadas com inibidores cujas funções não estão bem estabelecidas. Foi sugerido, no entanto, que os inibidores agem de modo decisivo na regulação do metabolismo protéico (2).

Podemos definir como "inibição" a diminuição ou retardamento transitórios de uma função ou atividade do organismo mediante a ação de uma substância adequada. Os inibidores de proteases são assim designados por apresentarem a capacidade de inibir as atividades proteolíticas de certas enzimas, podendo exercer, assim, um controle das referidas enzimas, em plantas.

A natureza dos inibidores de enzimas proteolíticas tem sido estudada desde que KUNITZ isolou uma proteína, oriunda da soja, com atividade inibitória altamente específica para tripsina (3, 4, 5, 6). Desde então, várias dessas substâncias têm sido isoladas, caracterizadas e sua importância evidenciada no que diz respeito ao valor nutritivo de certas plantas. A maioria dos inibidores isolados são inibidores de tripsina, entretanto existem também inibidores de outras enzimas (4, 7, 8, 9).

I.2 - Ocorrência natural dos inibidores

Os inibidores naturais de enzimas proteolíticas ocorrem em diferentes famílias do reino vegetal, bem como em diversas famílias do reino animal e em microrganismos. Dentro do reino vegetal a família das Leguminosas é a mais investigada (2, 3, 10, 11) talvez diante da importância assumida pelas sementes de legumes como uma fonte de proteína básica na alimentação humana e talvez também pelo fato de antigamente ter-se chegado a pensar que os inibidores de protease eram característicos desta família. No reino animal foi observada a presença de inibidores de enzimas proteolíticas na gema do ovo de aves, suco pancreático, sangue e urina de animais, *Ascaris lumbricoides* e várias outras fontes (3, 8, 9).

I.3 - Distribuição na planta

A maioria dos inibidores de proteases de plantas está localizada nas sementes, porém estes não estão restritos a esta parte da planta, tendo já sido isolados inibidores de folhas, tubérculos e raízes (3, 12). A distribuição dos inibidores em um mesmo órgão pode também não ser uniforme, como é o caso dos inibidores de tripsina nos cotilédones de *Vigna unguiculata* (13). HONAVAR e SOHONIE, 1955, mostraram que as folhas jovens de batata são mais ricas em inibidor de tripsina que as folhas mais velhas e que o caule apresentava uma concentração muito baixa deste inibidor (2, 3, 12). AMBE e SOHONIE, 1956, observaram, em estudo com *Faba vulgaris* e *Dolichos lablab*, que os inibidores de tripsina são distribuídos por todas as partes da planta, ocorrendo porém variação quantitativa, dependendo do estágio de desenvolvimento da mesma (3, 12, 14). Apesar da ocorrência generalizada, a quantidade de inibidores presentes não só nas várias espécies, como também entre espécies no mesmo gênero e até mesmo entre variedades de uma mesma espécie, é extremamente variável (3,

11). Experiências com inibidores de tripsina de soja evidenciaram que a atividade trípica era mais inibida pelos extratos de sementes que pelos de folhas e caule jovens, de modo que a concentração do fator de inibição aumentava na planta madura (14).

A atividade inibitória era mais alta nas sementes, mais baixa na raiz e intermediária nas folhas e caules (3). A observação de que a concentração do inibidor é relativamente alta nestes tecidos jovens e baixa em tecidos mais velhos sugere que os inibidores podem desempenhar um importante papel na regulação do metabolismo proteico. A ubiquidade dos inibidores de proteases, isto é, o fato dos inibidores de proteases se encontrarem, ao mesmo tempo, em mais de um lugar, enfatiza a hipótese de sua possível função no metabolismo de plantas.

I.4 - Propriedades físicas e químicas de inibidores de planta

Os inibidores de protease de plantas têm sido isolados em alto grau de pureza e mostrados serem proteínas com pouca ou nenhuma quantidade de carboidratos (3, 4, 5, 11, 12). A propriedade física mais notável dos inibidores, como uma classe de proteína, é a sua estabilidade sob as condições usuais de desnaturação (15). Alguns inibidores apresentam características pouco comuns entre as proteínas - são estáveis ao calor, às soluções que precipitam proteínas (ácidos e álcalis), à uréia e dificilmente têm suas pontes dissulfeto reduzidas (15).

Os inibidores de origem vegetal apresentam alto teor de cistina e são geralmente moléculas pequenas com peso molecular abaixo de 80.000 daltons. A maior parte deles são proteínas contendo entre 70 e 90 aminoácidos, correspondendo a um peso molecular entre 8.000 e 10.000 daltons e os de peso molecular aparentemente grande são, em geral, proteínas poliméricas em sua forma nativa (normalmente di, tri ou tetramé-

ricas) cujos protômeros têm pesos moleculares em torno de 10.000 daltons (11).

I.5 - Especificidade e reação com proteases

Os inibidores naturais de tripsina são proteínas capazes de se combinar com a tripsina para formar um complexo inativo. Isto representa um exemplo de reação entre duas moléculas protéicas resultando na formação de uma terceira proteína. Um aspecto importante da inibição de enzimas proteolíticas é o estudo da especificidade, da estequiometria e da cinética de interação da enzima com um determinado inibidor. O mecanismo e a cinética da inibição de tripsina, foram investigados detalhadamente e foi observado que ela se combina com o inibidor em uma reação reversível dependente do pH (4,11).

Entre os inibidores específicos para as diferentes classes de enzimas proteolíticas - proteases serínicas, sulfidrílicas, ácidas e metaloproteases - aqueles relacionados as proteases serínicas são os mais estudados (11, 16). A especificidade é uma característica marcante das reações com inibidores. O inibidor isolado por KUNITZ (3, 4, 5) tem servido como modelo fundamental, no que diz respeito à cinética e à termodinâmica da inibição de tripsina e também às propriedades dos polipeptídios em geral. Os inibidores têm sítios ativos para a inibição de enzimas proteolíticas, correspondendo à especificidade da enzima (16). O inibidor compete com o substrato pelo centro ativo da enzima. O inibidor específico de tripsina tem sempre uma ligação lisina-X ou arginina-X nos sítios ativos (2, 11, 16, 17).

Estes sítios são parte de uma grande área de ligação necessária à própria estrutura que confere a estabilidade habitual do complexo enzima-inibidor.

Se levarmos em consideração o inibidor de soja, podemos observar que este exerce sua ação inibitória sobre cer-

tas enzimas, entre as quais estão tripsina, α -quimiotripsina, quimiotripsina B, tromboplastina e elastase. Este inibidor, no entanto, não inibe enzimas tais como pepsina, carboxipeptidase, trombina, papaína e outras (5). Há evidências, porém, que certos inibidores de proteases serínicas atuam também contra enzimas de outras classes, como por exemplo o inibidor de tripsina de soja (KUNITZ) que inibe uma enzima microbiana, a clostripaína, semelhante a tripsina, mas que tem sítio catalítico de uma protease sulfidrídica (18). Muitos inibidores inibem tanto tripsina como quimiotripsina, podendo a ligação dessas enzimas ao inibidor ocorrer em um mesmo sítio reativo ou em sítios reativos diferentes (19). Observações sugerem que estes inibidores são de "dupla cabeça", isto é, possuem dois sítios de combinação independentes, um para cada enzima (2, 3, 11, 20).

No que diz respeito à estequiometria, podemos observar que o termo "inibição estequiométrica" é aplicado quando o complexo enzima-inibidor formado tem constante de dissociação muito baixa, ou seja, tem pequena tendência para dissociar-se. KUNITZ, em 1947, foi o primeiro a mostrar que a inibição da tripsina pelo inibidor cristalino de soja era diretamente proporcional à quantidade de inibidor adicionado (3, 5).

1.6 - Estrutura química e atividade inibitória dos inibidores

Uma das maneiras fundamentais para se compreender o mecanismo de inibição de proteases pelos inibidores naturais é através da elucidação da sequência de aminoácidos do inibidor, cuja característica mais notável é a semelhança extraordinária entre a sequência na região dos sítios ativos (21). Pelo fato das pontes dissulfeto exercerem importante papel na arquitetura da proteína, é de muito interesse determinar o pareamento destes resíduos de meia cistina. De maneira ge-

ral, podemos observar que as clivagens redutiva ou oxidativa dos enlaces dissulfeto são acompanhadas por uma perda na capacidade para inibir tripsina tão bem como perda de sua antigenicidade (22, 23).

A estrutura primária de alguns inibidores, proporciona fortes evidências químicas para a estrutura extraordinariamente simétrica no caso de inibidores bifuncionais de proteases. Existem indicações de que a conformação requerida para certos inibidores de tripsina e quimiotripsina é essencialmente a mesma, ou muito parecida e que as especificidades dos inibidores são determinadas, predominantemente, pela natureza dos resíduos no sítio reativo (11). Através dos estudos de determinação da estrutura primária e também dos níveis estruturais mais complexos, das evidências termodinâmicas, cinéticas, etc., podemos concluir que os inibidores formam complexos fortemente associados e que um único resíduo de aminoácido do inibidor, compatível com a especificidade de substratos da enzima, é necessário à atividade inibitória (23). Desta maneira, o método mais comum para assegurar a prioridade de resíduos de aminoácidos específicos para a atividade biológica de uma proteína envolve a modificação química seletiva de grupos funcionais a partir desses resíduos de aminoácidos.

I.7 - Mecanismo de interação dos inibidores com proteases

A maneira pela qual os inibidores de proteases já purificados se combinam com certas enzimas tem sido objeto de estudos pelo fato de proporcionar um sistema-modelo excelente para estudos de interações proteína-proteína.

Os inibidores da proteína tripsina são proteínas que se ligam fortemente à tripsina, obstruindo seu sítio ativo (24). Há evidências de que vários inibidores de tripsina agem de modo idêntico e proporcionam fortes ligações específicas entre moléculas proteicas.

Contribuições bastante significativas para melhor compreensão do mecanismo de interação da tripsina com o inibidor de tripsina surgiram com a observação de que a interação de tripsina com o inibidor de KUNITZ envolvia a clivagem específica da ligação arginil-isoleucina, do mesmo (3). Os chamados mapas de alta resolução obtidos por difração de raios X, mostraram que somente 12 dos 181 aminoácidos, que compõem o inibidor de KUNITZ, fazem contato com a molécula de tripsina (11, 25). Medidas calorimétricas mostram que a ligação do inibidor de tripsina de soja e a tripsina é endotérmica, refletindo a entalpia relativamente alta da forma tetraédrica, mas uma grande entropia térmica estabiliza o complexo (3, 24). A técnica de difração de raios X contribuiu de maneira bastante significativa para o estudo do complexo enzima-inibidor em vários estágios, tais como o agregado dimérico, estrutura e conformação de cada uma das moléculas que formam o complexo e por fim a região de contato entre a enzima e o inibidor. Através dessas evidências (15, 25) foi possível chegar-se às seguintes conclusões:

- os inibidores se ligam à enzima como bons substratos, indicando com isto, que o sítio ativo dos diferentes inibidores de tripsina apresentam conformação idêntica;
- a energia que favorece a alta constante de ligação entre a enzima e o inibidor é proveniente da soma das energias dos vários tipos de interação, que em sua maioria são de natureza entrópica;
- o complexo formado existe numa forma de aduto tetraédrico estável, resultante da natureza do sítio ativo da enzima.

I.8 - Significação nutricional dos inibidores

Os legumes constituem importante fonte de proteína alimentar, principalmente nos países onde o consumo de proteína animal é limitado, não apenas pela sua inviabilidade econômica, como também pela imposição de hábitos religiosos e culturais (7). Os legumes têm, portanto, assumido papel de grande significação no que diz respeito à dieta humana. É fato comprovado que muitos vegetais apresentam ampla variedade de substâncias, tais como inibidores de proteases, fitohemaglutininas, glicosídeos cianogênicos, etc., consideradas tóxicas para o organismo animal, contribuindo assim para a diminuição do valor nutricional de vários alimentos de origem vegetal, especialmente os legumes (4, 7, 26). A descoberta de inibidores de tripsina e seu possível envolvimento no valor nutritivo de alimentos de origem vegetal, resultou em trabalhos de investigação da química, bioquímica e propriedades nutricionais destes fatores. Existem evidências de que em muitos animais a ingestão de inibidores de tripsina leva a uma hipertrofia pancreática imediata, podendo esta ser evitada caso os inibidores sejam inativados previamente (22).

Desde que foi demonstrado o efeito benéfico do tratamento pelo calor, sobre o valor nutritivo da soja, por OSBORNE e MENDEL, em 1917 (3, 12), um grande esforço tem sido dirigido para a identificação do fator ou fatores responsáveis pelo efeito deletério e de retardamento no desenvolvimento animal, induzidos por alguns alimentos crus de origem vegetal (2, 12). Deste modo, a maioria dos efeitos tóxicos de legumes pode ser parcial ou inteiramente eliminada pela aplicação do calor. Este efeito é manifestado pelo aumento geral do valor nutritivo das proteínas de legumes, de modo que o aproveitamento da proteína aumenta proporcionalmente com a destruição dos inibidores (3, 7, 11). O simples método de cozimento pode eliminar estes efeitos antinutricionais, elevando assim o valor nutritivo de muitos legumes.

A toxicidade parcial ou total dos inibidores pode

também ser eliminada através de outras maneiras como: suplementação de enzimas proteolíticas à dieta, eliminação dessas proteínas tóxicas através de fermentação ou pela utilização de sementes germinantes (7).

I.9 - Significação fisiológica dos inibidores

Apesar dos trabalhos existentes sobre isolamento, caracterização estrutural e mecanismo de interação entre enzimas proteolíticas de animais e inibidores de planta terem sido iniciados acerca de cinquenta anos, ainda hoje, o papel fisiológico dos inibidores de proteases em plantas, é algo bastante confuso (3). Entretanto, atualmente, diante dos conceitos de "turnover" de proteínas, regulação de enzimas e proteção da planta através do controle biológico, as possíveis funções dos inibidores "in vivo", não podem ser ignoradas. Nos recentes progressos obtidos em relação a fisiologia de inibidores naturais de enzimas proteolíticas foi sugerido que estes podem desempenhar papéis importantes, funcionando como (2, 11, 12, 16, 27, 28, 29):

- agentes reguladores do controle das proteases endógenas;
- proteínas de reserva;
- agentes protetores contra proteases de insetos e microrganismos.

Como a atividade enzimática é aumentada durante o progresso da germinação, verificou-se que a medida que o processo germinativo evoluía os inibidores desapareciam. Foi observado que a atividade inibitória da tripsina de extratos de feijão seridô (*Vigna unguiculata*) diminui continuamente durante a germinação (30). Fatos idênticos foram observados durante a germinação da cevada e da alfaca, isto é, os inibidores de proteases endógenas desaparecem antes de iniciar o aumento da atividade endopeptidásica (31, 32). Nestes casos,

os inibidores parecem ter função reguladora da proteólise. No entanto, os inibidores de protease em sementes de arroz e de ervilhas não controlam a atividade das enzimas proteolíticas, apesar de serem, aparentemente, destruídos durante os estágios iniciais da germinação (28). Idêntico resultado foi também obtido com inibidores de proteases em soja, chegando-se a conclusão que nestas sementes, eles não funcionam como inibidores de proteases endógenas.

Supõe-se que os inibidores possam desempenhar função de proteína de reserva devido às altas concentrações de inibidores detectadas em sementes e tubérculos. O funcionamento dos inibidores como material de reserva protéica foi provado através de técnicas imunológicas durante os estudos realizados sobre o ciclo de vida dos tubérculos da batata (16). Evidências bem mais diretas, utilizando anticorpos específicos marcados com ferritina, confirmaram que o inibidor I, de quimiotripsina de batata, é um componente dos corpos protéicos vacuolares (16). Os inibidores além de serem encontrados nos tecidos de reserva, são também localizados em outras partes das plantas, tais como broto, raiz, caule e folhas. A sua presença, no entanto, em todos estes casos é aparentemente transitória, indicando que eles desempenham uma função de reserva, apenas temporária.

A função mais complexa e talvez a mais potencialmente útil dos inibidores para as plantas é aquela que se refere a proteção contra pragas. O inibidor pode se apresentar como fator importante no sentido de proteger a planta, no que diz respeito ao ataque de microrganismos e também ao ataque de insetos.

Inúmeros microrganismos podem secretar enzimas proteolíticas, tais como pronase e subtilisina, semelhantes a tripsina e quimiotripsina em suas especificidades e que têm por finalidade lisar as paredes celulares dos vegetais, facilitando assim a invasão microbiana nos tecidos da planta (16). A presença dos inibidores nos tecidos vegetais pode retardar a proteólise das paredes celulares e das proteínas da membrana, reduzindo, assim a possibilidade de uma desorganiza-

ção celular e conseqüentemente evitando a penetração dos microrganismos. Muitos são os inibidores, de origem vegetal, que inibem as enzimas digestivas do trato intestinal de insetos e suas larvas (11). Devido a este fato, alguns autores admitem que os inibidores surgiram como um mecanismo de defesa da planta contra o ataque de insetos. Estudos recentes (33, 34, 35, 36) mostram que o ataque de insetos à folha do tomateiro induz a liberação de um hormônio (PIIF - "proteína se inibitor inducing factor") o qual é distribuído rapidamente por toda a planta, favorecendo a síntese acelerada de inibidores. Isto pode levar a um conceito novo de possível imunidade induzida por certas pragas e também por certos microrganismos patogênicos.

Objetivos da investigação

Este trabalho visa uma caracterização parcial dos inibidores de tripsina de *Adenantha pavonina* (carolina). Pretende-se isolar e caracterizar, parcialmente, um inibidor de tripsina em *A. pavonina* e tentar demonstrar sua presença, não só na semente, como em outros órgãos da planta tais como folhas e vagem.

O presente trabalho tem também como objetivo estabelecer condições de ensaio ideais para a hidrólise de azocaseína por tripsina, a fim de usar este substrato nas determinações de atividade antitriptica.

II - MATERIAIS E MÉTODOS

A. MATERIAIS

No presente trabalho foram utilizadas sementes quiescentes, folhas em quatro estágios de desenvolvimento, vagens verdes e cotilédones de vagens verdes de *Adenanthera pavonina* (carolina) obtidos nos jardins do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará.

Azo-caseína preparada a partir de caseína segundo Hammarsten, esta obtida de E. Merck AG Darmstadt, Alemanha.

Tripsina bovina - Preparações cristalinas adquiridas de Nutritional Biochemicals Co. (NBCo) - EUA.

α -Quimiotripsina bovina - Preparação cristalina adquirida de Sigma Chemicals Co., St. Louis - EUA.

Dietilaminoetil celulose (0,84 meq/ml) - Produto de Nutritional Biochemicals Corporation, EUA.

SP - Sephadex C 50 (Lot. nº 2653 - capacidade: 2,3 \pm 0,3 meq/g) - Produto de Pharmacia Fine Chemicals, Suécia.

N - Acetil - DL - fenilalanina β -naftil ester (APNE) - Preparação cristalina de Sigma Chemicals Co., St. Louis, EUA.

O - Dianisidina tetrazotizada - Preparação adquirida de E. Merck AG, Darmstadt, Alemanha.

Acrilamida e N - N'Metilenobisacrilamida - Produtos de Eastman Organic Chemicals, Rochester, N. Y. EUA.

Anfólitos carreadores (pH 3-6) - LKB - Produkter AB Suécia.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

B. MÉTODOS

1. Descrição da planta

Carolina (*Adenanthera pavonina*, Linn) da família das Leguminosas Mimosoideas.

Árvore de até 15m de altura, inerme e glabra é empregada na arborização de parques e jardins. As folhas pecioladas, bipinadas, 2-5 pares de pinas opostas, com 6-10 folíolos curtos, peciolados, tem ação antireumática. Apresentam vagem comprida, estreita curvado-falconada, cujas valvas se enroscam, na maturação, jogando a curta distância as sementes, que são muito duras, vermelhas e luzídias. Conhecida também com o nome de tento, esta Mimosoidea é nativa da Ásia Tropical (37, 38).

A semente de carolina, com um peso médio de 1,36g é constituída por uma camada externa rígida, o tegumento, que corresponde a 17,65% do peso total da semente e de dois cotilédones, contendo 38,0% de proteínas, que quando dialisadas contra água, apresentam uma relação 2:1 entre as globulinas e as albuminas (39).

2. Preparação de azo-caseína

Esta preparação foi feita tendo por base o método desenvolvido por GOAD (40) com algumas modificações.

- As seguintes soluções são preparadas previamente e mantidas em um banho de gelo:

- Solução A

Ácido sulfanílico	0,616 g
Brometo de potássio	0,084 g
Ácido clorídrico 1 N	45,0 ml
Água destilada	37,0 ml

- Solução B - Nitrito de sódio 0,2 M

Nitrito de sódio	0,276 g
Água destilada	20,0 ml

- Caseína 2%

Caseína	4,0 g
Hidróxido de sódio 0,1 N	200,0 ml

- Cloreto de sódio - 0,1 M

NaCl	11,69 g
Água destilada q.s.p.	2000,0 ml

1 - À solução A são adicionados 18 ml de solução B, sob agitação, mantendo-se a temperatura inferior a 0°C. A adição deve ser feita gota a gota e num período de aproximadamente, 10 minutos. Deixa-se a solução final (A + B) agitando por 15 minutos no banho de gelo. Esta solução contém ácido sulfanílico diazotizado (ASD).

2 - A solução de ASD é adicionada, gota a gota, num período de 10 minutos, à solução de caseína. Durante a adição ambas as soluções devem permanecer no banho de gelo. No processo de diazotização o pH é mantido em torno de 10 pela adição de NaOH 1 N. Após a adição total do ASD a mistura fica sob agitação por mais 15 minutos, no banho de gelo.

3 - O pH da mistura é ajustado a 7,0 com HCl 1 N, a fim de deter a reação.

4 - A solução de azo-caseína é dialisada exaustivamente contra NaCl 0,1 M por 24 horas e contra água destilada por mais 48 horas.

5 - A solução dialisada é então tratada com TCA 100% de tal modo que a suspensão apresente uma concentração final de 2,5% do ácido.

6 - A suspensão, após algumas horas de repouso, é filtrada a vácuo, em funil de placa porosa, lavando-se o precipitado com 1 (um) litro de TCA 2,5%.

7 - O precipitado é ressuspenso em 100 ml de água destilada, dialisado contra água por 48 horas e liofilizado.

3. Preparação de solução de azo-caseína a 1,5%

Azo-caseína	1,5 g
Tampão fosfato 0,1 M pH 7,6	100,0 ml

Pesar 1,5 g de azo-caseína e dissolver em tampão fosfato a 0,1 M pH 7,6. Aquecer e deixar em ebulição por 15 minutos. Deixar esfriar e ajustar, em seguida, o pH para 7,6. Completar o volume para 100 ml com água destilada. Esta solução é mantida em congelador (-19°C).

4. Preparação da farinha de sementes

Sementes quiescentes de carolina, após remoção do tegumento, foram utilizadas para a preparação da farinha. As amêndoas, após fragmentação grosseira, foram delipidadas com hexana. Os fragmentos livres de óleo e secos (evaporação ao ar) foram triturados em moinho Wiley, até obtenção de uma farinha de granulação igual a 40 malhas por polegada linear (mesh). Esta farinha, armazenada em recipientes limpos e hermeticamente fechados, a 25°C, foi utilizada para os estudos relatados.

5. Purificação parcial dos inibidores

Foram usadas três soluções extratoras (água, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6 / NaCl 1% e tetraborato de sódio 0,1 M, pH 8,0 / NaCl 1%) com a finalidade de se verificar com qual delas se obtinha maior rendimento de inibidores de tripsina.

Quinhentos miligramas de farinha foram suspensas em 9,5 ml de solução extratora e deixadas em repouso durante 30 minutos, à temperatura ambiente, com agitação ocasional. Em seguida, a suspensão foi centrifugada por 20 minutos a 2500 xg à temperatura ambiente. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante (extrato total), filtrado em papel qualitativo (Frama). O filtrado foi armazenado em congelador (-19°C), para posterior ensaio de atividade antitriptica e determinação de proteínas.

O extrato total, obtido pelo método acima, usando-se o tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6 / NaCl 1% foi dialisado contra água destilada durante 24 horas e em seguida liofilizado. O material obtido foi denominado Inibidor Bruto (IB).

6. Precipitação com sulfato de amônio

Três gramas de farinha delipidada, foram suspensas em 60,0 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6 / NaCl 1%. O extrato total (ET), obtido como descrito anteriormente, foi então distribuído em tubos (8,0 ml/tubo) e a cada um deles adicionado $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em quantidade suficiente para se obter saturação de 0%, 20%, 40%, 60%, 80% e 100%. Após dissolução do sulfato de amônio os tubos foram deixados em repouso, a 4°C por 24 horas, quando as amostras foram, então, centrifugadas a 2500 xg por 20 minutos à temperatura ambiente. Cada precipitado foi ressuspenso em 8,0 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6 / NaCl 1% e dialisado contra o mesmo tampão. A atividade antitriptica e a concentração de proteínas foram medidas em cada fração dialisada.

Foi observado que a maior quantidade de inibidores de tripsina se encontrava nos precipitados de 40% e 60% de saturação, razão pela qual passou-se a utilizar um esquema de precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com o qual obtivemos os inibidores precipitáveis entre 40-60% de saturação.

Inicialmente, o procedimento evidencia a extração de inibidores, propriamente dita. Após centrifugação a

2500 xg o precipitado é desprezado e o sobrenadante submetido a precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 40% de saturação. Após 24 horas de repouso, à temperatura de 4°C e centrifugação por 20 minutos, o precipitado é ressuspense em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6 / NaCl 1%, dialisado contra o próprio tampão por 24 horas e armazenado no congelador para posterior ensaio de atividade e concentração de proteínas. O sobrenadante, no entanto, é submetido a nova precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até um percentual de saturação de 60%, permanecendo também, em repouso a 4°C por 24 horas. Após centrifugação o sobrenadante é dialisado contra o tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6 / NaCl 1% e guardado no congelador. O precipitado é ressuspense em tampão, já referido acima, e uma alíquota de 2,0 ml da suspensão é dialisada contra o próprio tampão, enquanto que o volume restante (\approx 27,0 ml) é dialisado contra água destilada e liofilizado. Em todas as etapas, a atividade antitriptica e a concentração de proteínas foram determinadas. A fração assim obtida foi denominada de F 4060.

7. Atividade da tripsina utilizando azo-caseína como substrato

a) Escolha da concentração ótima de azo-caseína

Partindo de uma solução de Azo-C a 1,0%, foram feitas diluições com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6 / NaCl 1%, de modo a obtermos Azo-C em concentrações finais de 0,17%, 0,33%, 0,50% e 0,67% quando fosse adicionado 1,0 ml de solução de enzima em um volume final de 3,0 ml. Os tubos foram colocados em banho-maria 37°C. Foi adicionado, então, 1,0 ml de solução de tripsina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e a mistura permaneceu no banho-maria durante 20 minutos. Após esse tempo 1,0 ml de TCA 10% era adicionado aos tubos, e os mesmos retirados do banho; às provas em branco era adicionado 1,0 ml de tripsina. Após repouso por 30 minutos as suspensões foram filtradas em papel de filtro qualitativo (Frama, 7 cm) e a absorvância dos filtrados, após alcalinização com NaOH 2 N na

proporção de 1:1, foi lida a 440 nm, em espectrofotômetro SPEKOL.

b) Espectro de absorção dos produtos de hidrólise

Para a determinação do espectro de absorção da Azo-C, usou-se o filtrado alcalinizado, correspondente ao tubo contendo 15 mg/ml de Azo-C, obtido do próprio ensaio para a atividade azo-caseinásica descrito acima. O espectro foi feito, manualmente, utilizando-se um espectrofotômetro Beckmann modelo D U.

c) Determinação da atividade triptica

A determinação da atividade da tripsina foi feita utilizando-se Azo-C como substrato (40).

Volumes crescentes, de solução diluída de tripsina, foram pipetados e completados para 1,0 ml com HCl 0,0025 M. Foi adicionado 1,0 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6/NaCl 1% a cada um dos tubos e em seguida estes foram colocados num banho-maria a 37°C por 5 minutos para haver equilíbrio de temperatura. A cada tubo foi adicionado 1,0 ml de Azo-C 1,5%. A mistura foi mantida no banho por 20 minutos após o que foi adicionado 1,0 ml de TCA 10% e os tubos retirados do banho. Provas em branco foram preparadas para as concentrações extremas de tripsina, sendo que nestas a adição do TCA 10% sempre precedeu a de Azo-C. As suspensões foram mantidas em repouso por 30 minutos e filtradas em papel de filtro qualitativo (Frama, 7 cm). Aliquotas de 1,0 ml do filtrado foram pipetadas em tubos de ensaio, e a estas adicionadas igual quantidade de NaOH 2N. A atividade enzimática, nos filtrados contendo peptídeos diazotizados, foi medida pela absorbância, em espectrofotômetro SPEKOL A 440 nm. As estimativas das provas em branco para as concentrações intermediárias de tripsina foram feitas por interpolação. A fim de se obter uma curva linear de atividade usou-se o artifício, sugerido por KAKADE e LIENER (41), pelo qual as

absorbâncias obtidas em 440 nm são elevadas a potência $3/2$.

Uma unidade de tripsina (TU), foi definida como sendo o aumento de 1 unidade de absorbância em 440 nm de uma mistura de reação sob as condições de ensaio (37°C/20 minutos).

8. Determinação da atividade antitriptica

A atividade inibitória das diversas preparações foi determinada pela atividade residual da tripsina. A avaliação consiste na medida da diferença entre a atividade triptica, determinada pelo método descrito acima, de amostras contendo quantidades crescentes de inibidor e a atividade de soluções de tripsina sem inibidor. Foram feitas correções usando-se provas em branco para a enzima e também para as concentrações extremas de inibidor. Para as concentrações intermediárias de inibidor, as estimativas de provas em branco foram feitas por interpolação.

Levando-se em consideração a expressão da unidade de atividade para tripsina (TU), a atividade antitriptica foi definida como sendo o número de unidades de tripsina inibida nas mesmas condições de ensaio.

9. Determinação de proteína

As concentrações de proteína do Inibidor Bruto e de outras frações foram determinadas pelo método do microbiureto a 330 nm (42) utilizando-se albumina sérica bovina como padrão. A avaliação de proteína nos eluatos das colunas cromatográficas, foi feita através da leitura de absorbância a 280 nm. Para ambas determinações foi usado o espectrofotômetro Beckman modelo DU.

10. Ação de ácidos sobre a F 4060

Com a finalidade de se verificar o comportamento da F 4060, em meio ácido, foram feitas medidas de atividade an

titríptica em amostras após tratamento por ácido tricloroacético. Neste experimento foram utilizadas amostras na concentração de 2 mg/ml em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6/NaCl 1% às quais se adicionou TCA nas concentrações de 2,5% e 5,0%. Após centrifugação do precipitado e diluição conveniente do sobrenadante, foi determinada a atividade antitriptica.

Na tentativa de se conseguir maior purificação da F 4060 foram feitos experimentos de precipitação por ácido. O procedimento foi o seguinte: 50 mg da F 4060 foram dissolvidas em 50,0 ml de tampão fosfato 0,08 M, pH 7,5; esta solução foi levada a pH 4,0 com ácido acético 30%, centrifugada a 2500 xg por 20 minutos, à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspenso em 5,0 ml de água destilada, dialisado contra água e feitos ensaios para determinar a atividade e o teor de proteína. O sobrenadante (ET) ácido foi também dialisado contra água e a atividade antitriptica e teor de proteínas determinados.

11. Preparação da farinha de folhas, vagem verde e cotilédones de vagem verde de *Adenanthera pavonina*

Após coletadas amostras de folhas, vagens e cotilédones estas foram colocadas em gral de porcelana e adicionado nitrogênio líquido para congelamento. As amostras congeladas foram liofilizadas. Após liofilização foram maceradas em gral até obtenção de uma farinha bem fina a qual foi mantida em recipientes limpos e hermeticamente fechados à temperatura ambiente. Em relação a vagem verde, no entanto, a farinha foi obtida através de moagem, usando-se neste caso, moinho Wiley, até obtenção de farinha de granulação igual a 40 malhas por polegada linear (mesh).

12. Extração de inibidor na farinha de folhas, vagem verde e cotilédones de vagem verde em *Adenanthera pavonina*

A metodologia empregada na extração do inibidor, em folhas, vagem verde e cotilédones de vagem verde foi praticamente a mesma descrita na extração da farinha de sementes. As diferenças estão apenas no que diz respeito à relação de extração (1/40), à solução extratora, que neste caso foi o KCl 1 M (43) e também quanto às condições de centrifugação 19.200 xg por 15 minutos a 6°C (SORVAL).

13. Cromatografia de troca iônica

Cromatografia de troca iônica em dietilaminoetil-celulose (DEAE-celulose) foi utilizada para fracionar a F 4060. DEAE-celulose, previamente suspensa em água para retirada de partículas finas, foi empacotada, sob a ação da gravidade, em um tubo de vidro de modo a se obter uma coluna de 18 x 1,3 cm. O adsorvente foi lavado com 100,0 ml de água destilada e em seguida, sucessivamente com NaOH 0,1 N, água, HCl 0,1 N, água, tampão fosfato 0,05 M pH 7,0 e, finalmente, equilibrada com tampão fosfato 0,005 M pH 7,0; 45 mg da F 4060 foi dissolvida em 4,0 ml do tampão de equilíbrio e dialisada por 18 h contra o mesmo tampão a uma temperatura de 4°C. Em seguida essa solução foi centrifugada a 2500 xg durante 20 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante límpido foi aplicado na coluna. A eluição foi feita, inicialmente, com o tampão de equilíbrio da coluna e continuada com um gradiente retilíneo de concentração molar formado por ácido cítrico 0,01 M pH 2,6 e ácido cítrico 0,2 M pH 2,05 (75+75 ml) e em seguida por ácido cítrico 0,2 M / NaCl 1 M pH 1,6. O fluxo foi mantido em aproximadamente 35,0 ml/hora, sendo o efluente recolhido, através de um coletor automático, em frações contendo 2,4 ml cada. A absorbância dos efluentes foi determinada a 280 nm. Para cada fração eluída determinou-se a atividade antitriptica, expressa em UI/ml, a fim de se observar o perfil de atividade.

inibitória das respectivas frações de proteína. As frações, contendo atividade inibitória, foram reunidas, individualmente, dialisadas contra água destilada e liofilizadas (F DEAE).

14. Cromatografia em SP - Sephadex C 50

Cromatografia de troca iônica em SP - Sephadex C 50, foi utilizada com a finalidade de se obter um melhor fracionamento do inibidor. SP - Sephadex C 50 foi equilibrada em funil de BÜCHENER através de lavagens sucessivas empregando-se HCl 0,1 N, água, Na OH 0,1 N, água e finalmente tampão acetato 0,005 M pH 5,0. Em seguida, sob a ação da gravidade, foi feito o empacotamento da coluna, em tubo de vidro de modo que a mesma apresentasse um leito de adsorvente de 18 x 1,3 cm. A coluna foi então lavada com 50,0 ml do tampão de partida. Desta maneira, a coluna estava pronta para receber a amostra e dar início ao cromatograma. Uma porção de efluente obtido por cromatografia em DEAE-celulose e contendo atividade inibitória foi dialisada contra tampão acetato 0,005 M pH 5,0 por 24 h à temperatura de 4°C. Após centrifugação a 2500 xg por 20 minutos à temperatura ambiente o sobrenadante límpido foi aplicado à coluna. A eluição feita inicialmente com tampão acetato 0,005 M pH 5,0 foi continuada com um gradiente de concentração salina, constituído de tampão acetato 0,005 M pH 5,0 / NaCl 0-1 M (75+75 ml), seguido por tampão acetato 0,005 M pH 5,0 / NaCl 1 M. O fluxo foi de 37,0 ml/hora e o efluente recolhido em frações contendo cerca de 2,1 ml por tubo. A absorbância destas frações foi determinada a 280 nm. A atividade antitriptica foi medida em cada fração expressa em UI/ml. As frações que continham inibidor de tripsina foram reunidas e dialisadas contra água destilada e liofilizadas (FSP₁). Procedimento idêntico foi aplicado à F 4060. As frações com atividade antitriptica foram reunidas, dialisadas contra água destilada e liofilizadas (FSP₂).

15. Cromatografia de afinidade em Sepharose 4 B-anidro-tripsina

Sepharose 4 B-anidro-tripsina liofilizada foi deixada entumescer em uma solução contendo 1 mg de TLCK em 10,0 ml de tampão TRIS 0,05 M-CaCl₂ 0,05 M/NaCl 0,05 M pH 8,0, em banho de gelo por 2h. O material entumescido foi então posto em uma seringa de 5 cc com o que se obteve uma coluna de 2 cm de altura. A Sepharose 4 B-anidro-tripsina foi equilibrada com tampão acetato 0,1 M, contendo NaCl 0,3 M pH 4,0, até que o pH do efluente atingisse um valor constante igual a 4,0. A coluna de gel foi armazenada a 4°C, em presença de tolueno até sua posterior utilização. A Sepharose 4 B-anidro-tripsina utilizada acima foi preparada por XAVIER FILHO (44).

15a. Determinação da capacidade da coluna

A coluna foi equilibrada com tampão fosfato 0,1 M / NaCl 0,3 M pH 7,6 até que os efluentes apresentassem o mesmo pH. Uma alíquota de 0,5 ml da F₂ da cromatografia em SP - Sephadex C 50, previamente dialisada por 24 h no tampão fosfato 0,1 M / NaCl 0,3 M pH 7,6, foi aplicada na coluna. A eluição foi feita com o mesmo tampão e os efluentes colhidos manualmente em frações de 2,0 ml/tubo. A partir do 8º tubo, a eluição foi continuada com HCl 0,01 M / NaCl 0,3 M sendo colhidas 7 frações de 2,0 ml cada, tendo a fração do inibidor sido eluída quando foi atingido o pH 4,0. A coluna foi, em seguida, lavada com tampão acetato 0,1 M / NaCl 0,3 M, tolueno e guardada a 4°C. A absorvância dos efluentes foi feita a 280 nm. A atividade antitriptica foi determinada em cada fração, sendo expressa em UI/ml. Foram feitas diversas cromatografias de afinidade empregando-se sempre o mesmo volume de amostra. As frações com atividade foram acumuladas. Após diálise por 24 h contra água foram concentradas e a atividade contra tripsina determinada.

16. Eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,1

Eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,1 foi feita de acordo com a técnica desenvolvida por CLARKE (45). Todos os experimentos foram efetuados à temperatura ambiente ($\pm 26^{\circ}\text{C}$) com voltagem constante (175 volts) e com duração de 30 minutos. A quantidade de proteína aplicada era da ordem de 100 μg por coluna de gel. Nas análises eletroforéticas foram aplicados 50 μl de solução das frações liofilizadas de inibidor bruto, das obtidas por precipitação com sulfato de amônio e também daquelas correspondentes ao inibidor separado por cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose; no que diz respeito à fração de inibidor isolado por cromatografia em SP - Sephadex C 50, a quantidade aplicada foi apenas 10 μl de uma solução contendo 2 mg/ml de proteína, ou seja, 20 μg por coluna de gel. A localização das bandas foi feita usando-se negro de amido a 1%, em ácido acético 7%, durante 30 minutos, e descoloramento por difusão em ácido acético 7%.

A visualização dos inibidores de tripsina, em gel de poliacrilamida a pH 8,1, foi efetuada de acordo com as técnicas descritas por URIEL e BERGER (46), adaptada por KAISER e BELITZ (47) e XAVIER FILHO e MOREIRA (48).

A quantidade da amostra aplicada por coluna de gel neste caso, era 10 vezes menor que nas experiências acima. Após eletroforese normal os géis foram retirados dos tubos de vidro e incubados com uma solução de tripsina (0,05 mg/ml em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4), a 37°C por 30 minutos. Após incubação os géis foram lavados 6 vezes com água destilada e reincubados a 37°C por mais 30 minutos, livres de solução. Depois dessa segunda incubação, os cilindros de gel, foram imersos em uma mistura constituída de APNE (2,5 mg/ml de dimetilformamida) e de uma solução de O-dianisidina tetrazotizada em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 (0,55 mg/ml) na proporção de 1:9. Passados 30 minutos, os géis foram retirados e lavados com uma solução de ácido acético 7% na qual foram guardados em ambiente protegido da luz.

17. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) foi feita de acordo com o método desenvolvido por WEBER e OSBORN (49). O tampão para o gel continha 7,8 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 38,6 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2 g de SDS por litro. A solução de acrilamida (37:1) foi preparada com 22,2 g de acrilamida e 0,6 g do metilenobisacrilamida em água para um volume final de 100,0 ml. Esta mistura foi sempre filtrada através de papel Whatman nº 1. O gel foi preparado na proporção de 2:1:4:1 em volume, correspondendo, respectivamente a tampão para gel, acrilamida, TEMED 100% e persulfato de amônio (15 mg/ml). A polimerização ocorreu à temperatura ambiente. O material designado como inibidor bruto (IB), a fração de inibidor de F 4060, o inibidor isolado por DEAE-celulose e também por SP-Sephadex C 50 foi dissolvido, em uma solução de tampão fosfato 0,01 M pH 7,0 contendo SDS 2%, resultando soluções finais de 1 mg/ml. Após incubação por 24 h à temperatura ambiente foram aplicadas 25 μl por coluna de gel, de modo que a concentração real foi de 25 μg por gel. Às soluções de proteínas foram adicionados sacarose e azul de bromofenol 0,05% em água, para aplicação às colunas de gel. O eletrólito foi o tampão para o gel diluído com 2 volumes de água. A eletroforese se desenvolveu à temperatura ambiente, com corrente constante e igual a 7 mA por coluna de gel durante 3h e 30 minutos.

As bandas de proteína foram localizadas através da imersão dos cilindros de gel em solução corante constituída de Coomassie Brilliant Blue 0,25% em metanol a 50% e ácido acético glacial (90,8:9,2). O descoramento foi feito pela imersão dos cilindros em solução de ácido acético 7%. Também foram efetuadas eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS para visualização de inibidores de tripsina. Nesses experimentos seguiu-se a técnica descrita por XAVIER FILHO e MOREIRA (48). Para a caracterização dos inibidores de tripsina em gel com SDS foram aplicados, aproximadamente

10 μ g de proteína por gel, os quais, após eletroforese normal, são mergulhados, em tubos contendo solução fixadora e deixados em agitação por uma noite. Após esse tratamento os cilindros de gel são imersos em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 por 2 h, após o que são incubados com solução de tripsina a 37°C por 30 minutos e assim por diante, tal como já descrito no item anterior.

18. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, β -mercaptoetanol e uréia 8 M

A metodologia aplicada para este tipo de eletroforese foi, praticamente, a mesma descrita para a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, tanto para a localização de bandas de proteínas como para a visualização dos inibidores de tripsina. A única diferença existente, foi na preparação da amostra a ser aplicada, a qual foi previamente aquecida a 100°C por 15 minutos. A concentração das amostras, previamente reduzidas por β -mercaptoetanol foi a mesma já descrita para eletroforese com SDS.

Foi feita eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS utilizando-se uréia 8 M para a preparação das amostras. O tempo de contato foi também de 24 h a partir da dissolução da amostra. A metodologia aplicada foi também a mesma utilizada para com o β -mercaptoetanol.

19. Focalização isoelétrica em placas de gel de poliacrilamida

Nos experimentos de focalização isoelétrica foi utilizado o método desenvolvido por AWDER e outros (50) e XAVIER FILHO e SOUZA (51). Na preparação do gel utilizou-se água destilada, uma solução de acrilamida 30%, contendo bisacrilamida (1%), mistura de anfólitos (pH 3-6, 40%) e persulfato de amônio (10 mg/ml) na proporção de 12:4, 5:4, 45:1. A solução assim preparada foi aplicada com auxílio de uma pipeta "Pasteur", entre duas placas de vidro

(20 x 9 cm) mantidas em posição horizontal, espaçadas por ligas de borracha de 0,5 mm de espessura e mantidas em posição por outras duas ligas. O conjunto, após aplicação do gel, ficou em repouso por cerca de 30 minutos, tempo suficiente para a polimerização. Para aplicação das amostras, as ligas que sustentavam as duas placas de vidro, foram tiradas com todo cuidado para não pressionar o gel, de modo que este ficasse preso a uma das placas. As amostras foram aplicadas no lado correspondente ao catodo em pequenas faixas de papel de filtro e a eletrofocalização desenvolveu-se durante 4 h, numa câmara úmida. Os eletrodos de grafite foram lavados com solução de etanolamina 0,4% (para o catodo) e ácido sulfúrico 0,2% (para o anodo). A quantidade de proteína aplicada foi cerca de 4 µg por amostra. A voltagem máxima utilizada foi de 100 volts. Após a corrente ter alcançado um mínimo, em torno de 0,6 mA, a placa foi retirada, o gel deslocado da placa de vidro e posto em uma placa de "Petri", contendo solução de tripsina 0,05 mg/ml em tampão de fosfato 0,1 M pH 7,4 e deixada, em agitação por 30 minutos. Enquanto isso, uma faixa longitudinal de 0,5 cm, que havia sido separada do gel, foi cortada em seções de 0,5 cm; estas foram colocadas em tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 2,0 ml de água destilada. Após 24 h, o pH, correspondente a cada segmento do gel, foi determinado e o gradiente estabelecido. A visualização dos inibidores de tripsina baseou-se no processo de coramento negativo descrito por URIEL e BERGER (46) e XAVIER FILHO e SOUZA (51). O gel após contato com a solução de tripsina foi lavado duas vezes, com água destilada e em seguida submerso na mistura de APNE (2,5 mg/ml em dimetilformamida) com o-dianizidina tetrazotizada em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 (0,55 mg/ml) na proporção de 1:9 durante um período de 30 minutos. Em seguida foi lavado com uma solução de ácido acético 7%. O gel foi então secado em um secador de gel. Foram feitos, também experimentos de focalização isoelétrica para localizar as bandas de proteína (52). Neste caso, a concentração das amostras, aplicadas, foi na ordem de 50 µg/µl. Após eletro-

focalização normal, o gel foi colocado em uma placa de "Petri", contendo o reagente de Reisner (52), solução corante composta por Coomassie Brilliant Blue G 250 0,25%, água e ácido perclórico 70% na proporção de 1:10:15 e deixado em contato por 2 horas em temperatura de 37°C. Para secagem do gel, a técnica foi a mesma empregada para a visualização dos inibidores, sendo que neste caso, após a coloração com o reagente de Reisner, a placa foi colocada em contato com ácido acético 7%.

III - RESULTADOS

1. Atividade da tripsina utilizando azo-caseína como substrato

1.a. Espectro de absorção dos produtos de reação

O espectro de absorção dos produtos de hidrólise de Azo-C por tripsina é mostrado na Fig. 1 e foi determinado em solução alcalinizada de filtrado da reação enzimática. Foram utilizadas cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico em um espectrofotômetro Beckmann modelo DU. Como podemos observar o espectro apresenta uma absorção máxima em 440 nm.

1.b. Efeito da concentração de azo-caseína

Na Fig. 2 pode ser vista uma curva de atividade triptica sobre Azo-C. Este experimento mostrou a concentração ideal de Azo-C que deveria ser usada nos ensaios de atividade antitriptica no decorrer deste trabalho. Como podemos observar houve saturação da enzima quando a concentração de Azo-C atingia valores acima de 0,5%. Ficou estabelecido que a concentração a ser usada seria de 0,5% no volume final (3,0 ml) da reação.

1.c. Atividade triptica

Na Fig. 3 vemos a curva de atividade triptica obti-

FIGURA 1

Espectro de absorção dos produtos de hidrólise de Azo-C
(15 mg/ml) por tripsina

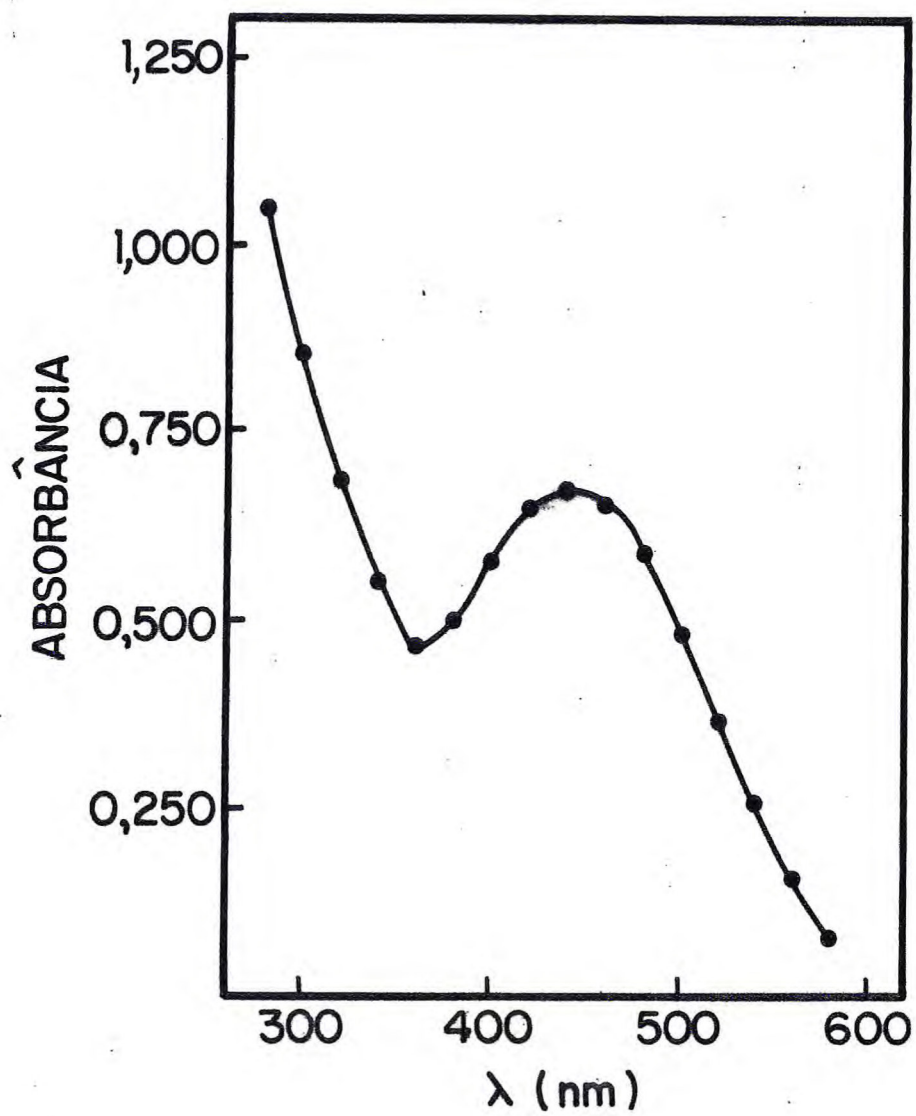


FIGURA 2

Curva de atividade triptica sobre a Azo-C.

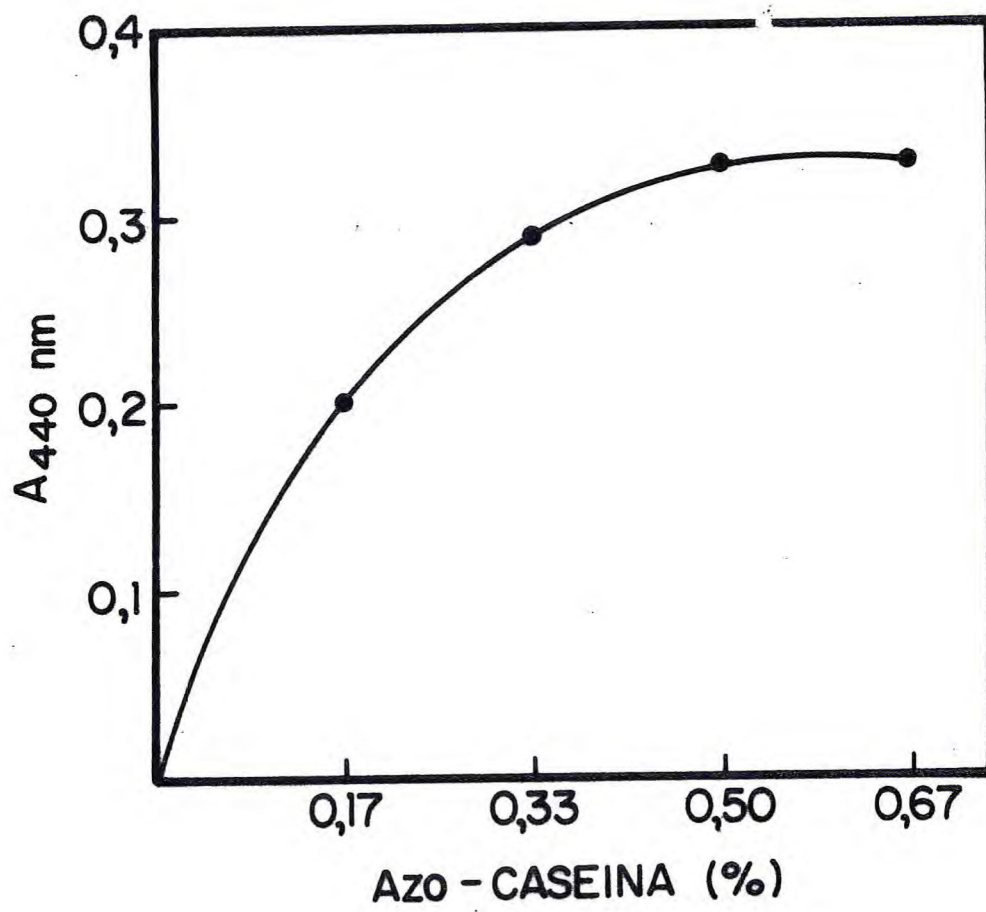
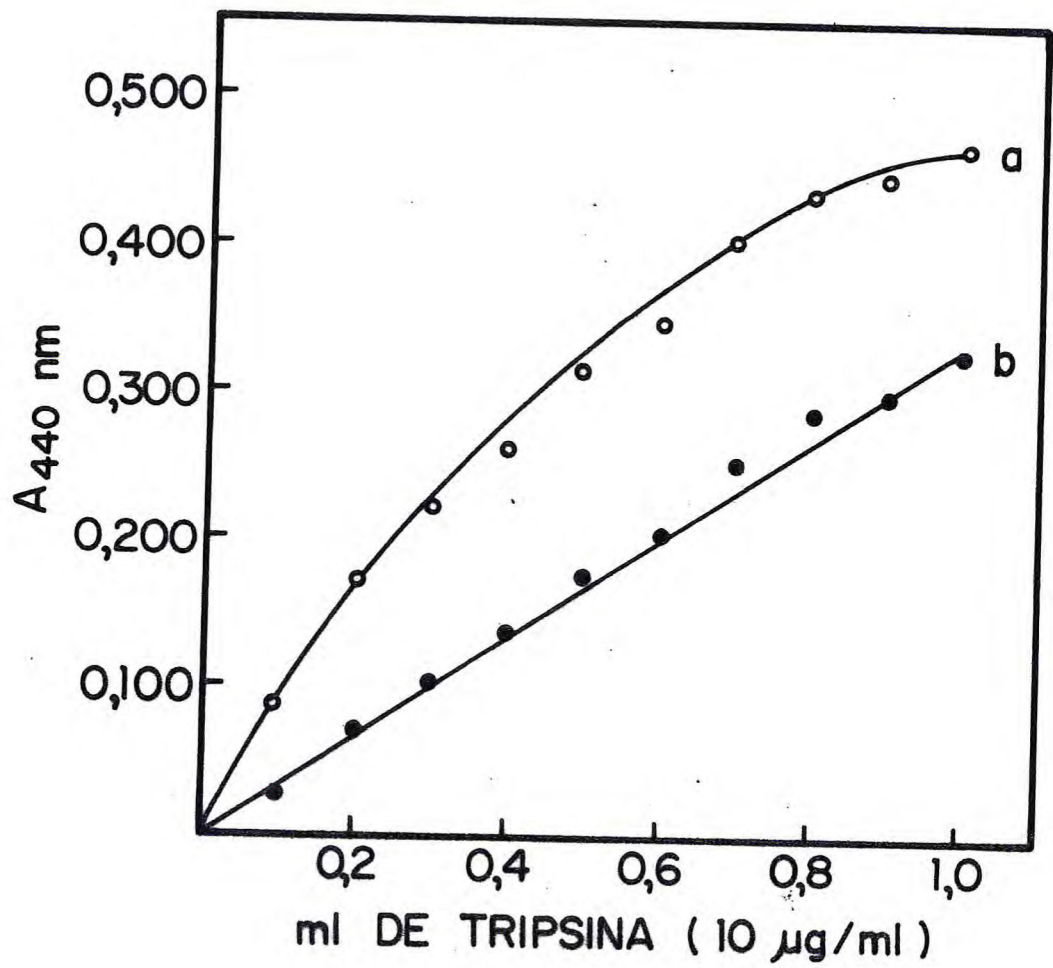


FIGURA 3

Curvas de atividade tríptica

a) (-o-o-o-) Absorbância

b) (-●-●-●-) Absorbância elevada a potência 3/2



da quando preparações de tripsina, em quantidades crescentes, foram incubadas com Azo-C a 1,5% usada como substrato, nas condições de ensaio pré-estabelecidas. A atividade enzimática lida em filtrados alcalinizados foi medida pela absorvância a 440 nm em espectrofotômetro SPEKOL. Como podemos observar, o gráfico de atividade não se apresentou retilíneo, razão pela qual tornou-se necessário recorrer ao artifício sugerido por KARADE e LIENER (41), pelo qual as absorvâncias obtidas a 440 nm são elevadas a potência $3/2$. Com isto foi possível obtermos um gráfico linear característico.

2. Atividade antitriptica

A atividade inibitória foi determinada pela atividade residual da tripsina; isto é, pela diferença entre a atividade triptica de soluções contendo apenas tripsina e a atividade triptica de amostras contendo tripsina e quantidades crescentes de inibidor. Isto pode ser observado na Fig. 4 onde temos curvas de atividade de preparações de tripsina, quando incubadas com quantidades crescentes de inibidor. Após a reação enzimática foi efetuada a leitura dos filtrados alcalinizados. A absorvância em 440 nm foi determinada usando-se um espectrofotômetro SPEKOL.

A tripsina utilizada nos ensaios tinha uma concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ em HCl 0,0025 M. No ensaio de atividade antitriptica, usando-se o extrato total obtido com extração 1:20 (massa:volume) em tampão fosfato 0,1 M pH 7,6 / NaCl 1%, foi observado que o mesmo apresentava 17.680 UI/g de farinha. Este mesmo extrato, quando submetido a diálise contra o tampão de extração, apresentou como resultado 15.270 UI/g de farinha. Houve portanto uma perda em torno de 14% na atividade inibitória em decorrência da diálise e cerca de 32% com a liofilização (Tabela I).

FIGURA 4

Curvas de atividade antitriptica no extrato total de *A. adenanthera pavonina* em tampão fosfato 0,1 M pH 7,6 / NaCl 1%

A) Extrato total

B) Extrato total dialisado contra tampão de extração

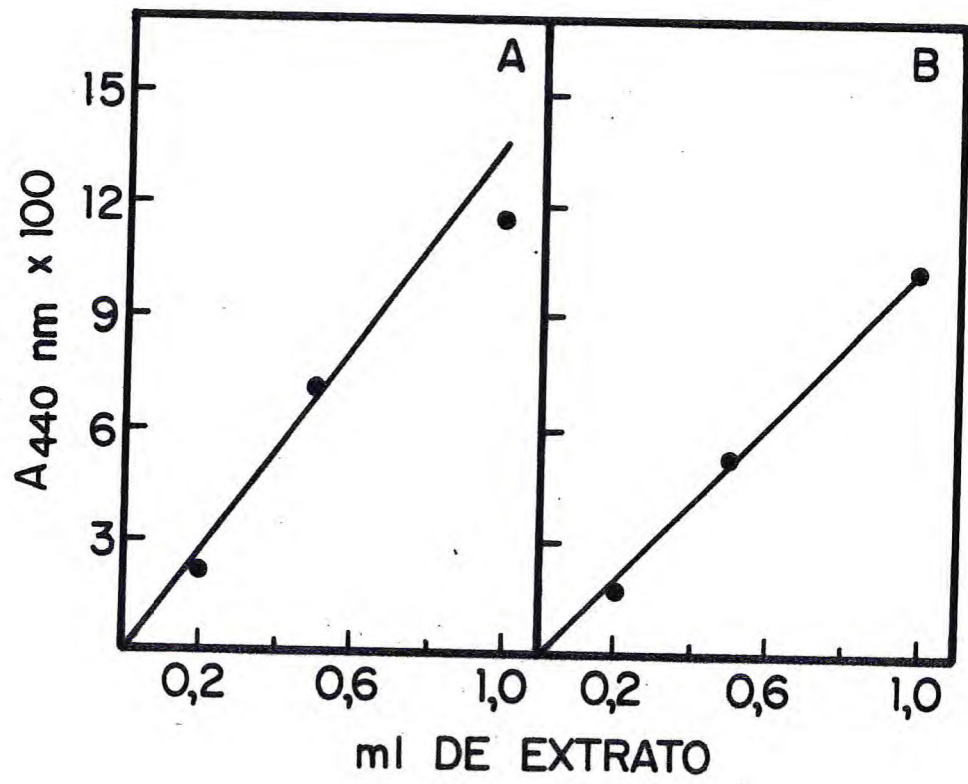


TABELA I - Atividade antitriptica em *Adenanthera pavonina*

- a) Extrato total
- b) Extrato total dialisado contra tampão de extração
- c) Extrato total liofilizado (FIB)

Amostra	UI/g de farinha	Rendimento (%)
a) Extrato total	17.680	100
b) Extrato total dialisado	15.270	86,4
c) Extrato total liofilizado	12.000	67,9

3. Purificação parcial dos inibidores

A Fig. 5 mostra o esquema utilizado para extração dos inibidores de *A. pavanina*. Foram usadas 3 soluções extratoras com a finalidade de se verificar com qual delas obtinha-se um maior rendimento de inibidores. Foi observado, que isto acontecia quando a extração era feita com tampão fosfato 0,1 M pH 7,6 / NaCl 1%. Este fato pode ser verificado na Tabela II onde podemos observar, também, a quantidade de proteína encontrada nos referidos extratos.

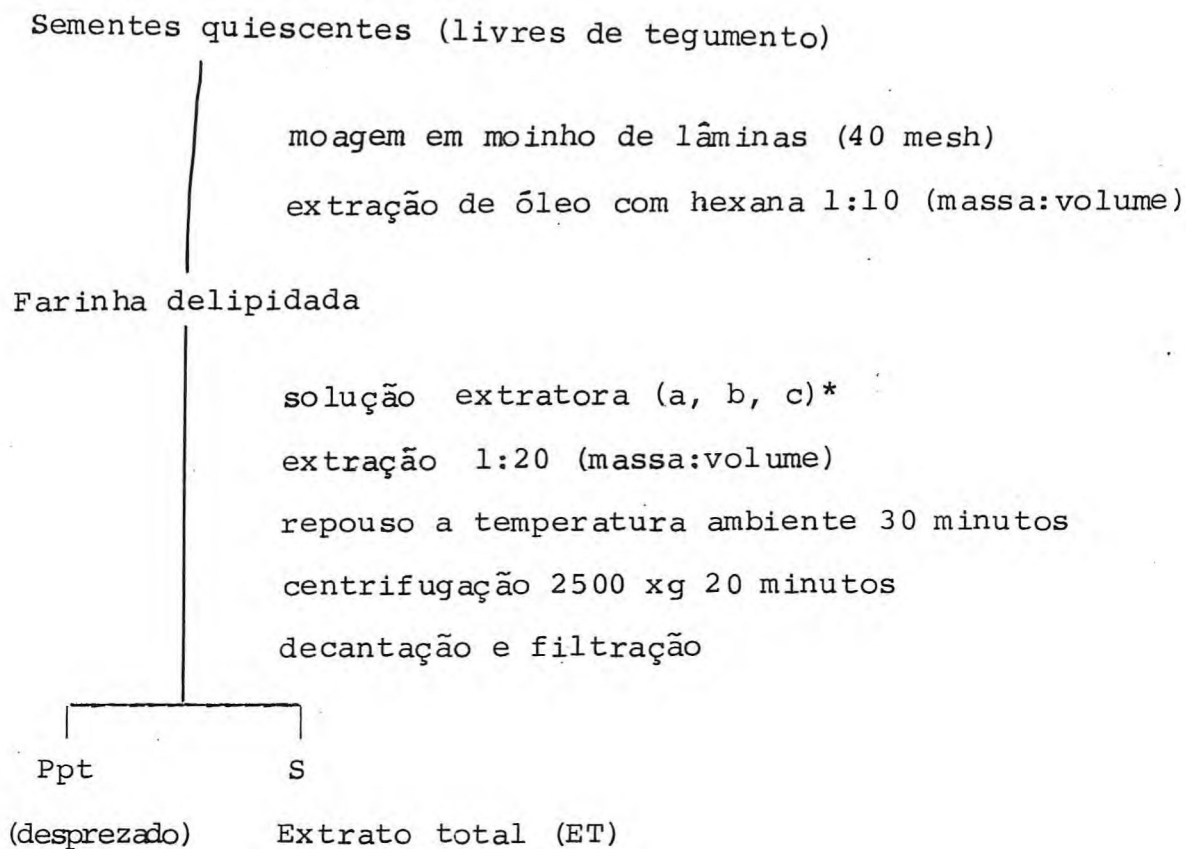
4. Precipitação de inibidores por sulfato de amônio

Por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, verificou-se que praticamente a totalidade da atividade antitriptica é obtida quando a saturação atinge 60% (Tabela III). Um gráfico das diferenças sucessivas entre os diversos níveis de saturação, para atividade e proteína (Tabela IV) é mostrado na Fig. 6. Como se pode verificar a maior precipitação ocorre entre 40 e 60% de saturação. Com base neste resultado foi feita uma nova precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, agora entre 40 e 60% de saturação.

A Fig. 7 mostra o esquema utilizado para a preparação do inibidor até a etapa de precipitação por sulfato de amônio. A fração assim obtida, com uma purificação de 1,8 vezes (Tabela V) foi utilizada nas experiências subsequentes.

FIGURA 5

Esquema utilizado para a extração de inibidores de *A. pavoni*
na



* a) água

b) Tampão fosfato 0,1 M pH 7,6 / NaCl 1%

c) Tampão borax (tetraborato de sódio) pH 8,0 / NaCl 1%

TABELA II - Extração de inibidores de farinha de *A. pavonina* (carolina) utilizando diferentes soluções extratoras.

a) Extrato obtido em água destilada

b) Extrato obtido em tampão fosfato 0,1 M pH 7,6 / NaCl 1%

c) Extrato obtido em tetraborato de sódio (borax) 0,1 M pH 8,0 / NaCl 1%

Soluções extratoras	UI/ml	UI/g de farinha	mgP/ml	mgP/g de farinha	Atividade específica (UI/mgP)
Água (a)	500	7.333	18,3	268,4	27,3
Tampão fosfato (b)	1.340	17.680	18,6	245,5	72,0
Tampão borato (c)	1.300	19.240	20,4	301,9	63,7

TABELA III - Precipitação de inibidores em diferentes níveis de saturação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Níveis de saturação (%)	UI/ml	Volume após diálise (ml)	UI/8 ml de ET	UI/ml de ET	UI/g de farinha	mgP/g de farinha
Controle	981	5,0	4.905 (5 ml)	981	14.715	207
0-20	40	8,4	336	42	630	7,65
0-40	137	8,7	1.191,9	148,9	2.233,5	40,5
0-60	633	10,5	6.646,5	830,8	12.462	139,5
0-80	494	14,4	7.113,6	889,2	13.338	130,5
0-100	380	21,4	8.132	1.016,5	15.247,5	85,5

TABELA IV - Dados obtidos através do processo de precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Níveis de saturação (%)	UI/8 ml de ET (-)	UI/ml de ET	UI/g de farinha	mgP/g de farinha (-)
Controle	-	981	14.715	207
0-20	336	42	630	7,65
20-40	855,9	106,9	1.603,5	32,85
40-60	5.454,6	681,8	10.227	99
60-80	467,1	58,3	874,5	-
80-100	1.018,4	127,3	1.909,5	-
Total	8.132,0			

FIGURA 6

Precipitação de inibidores de *A. pavonina* com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

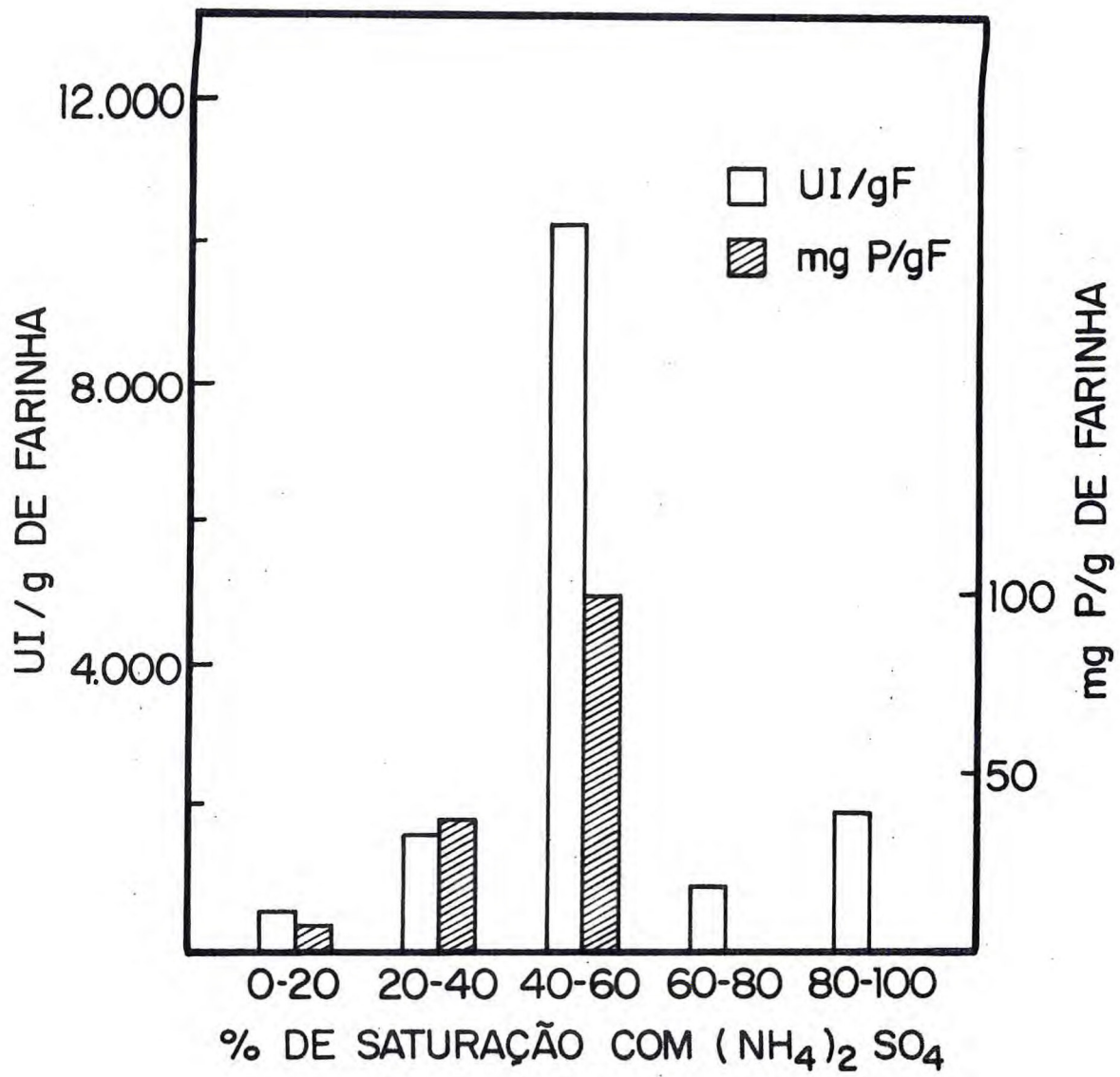
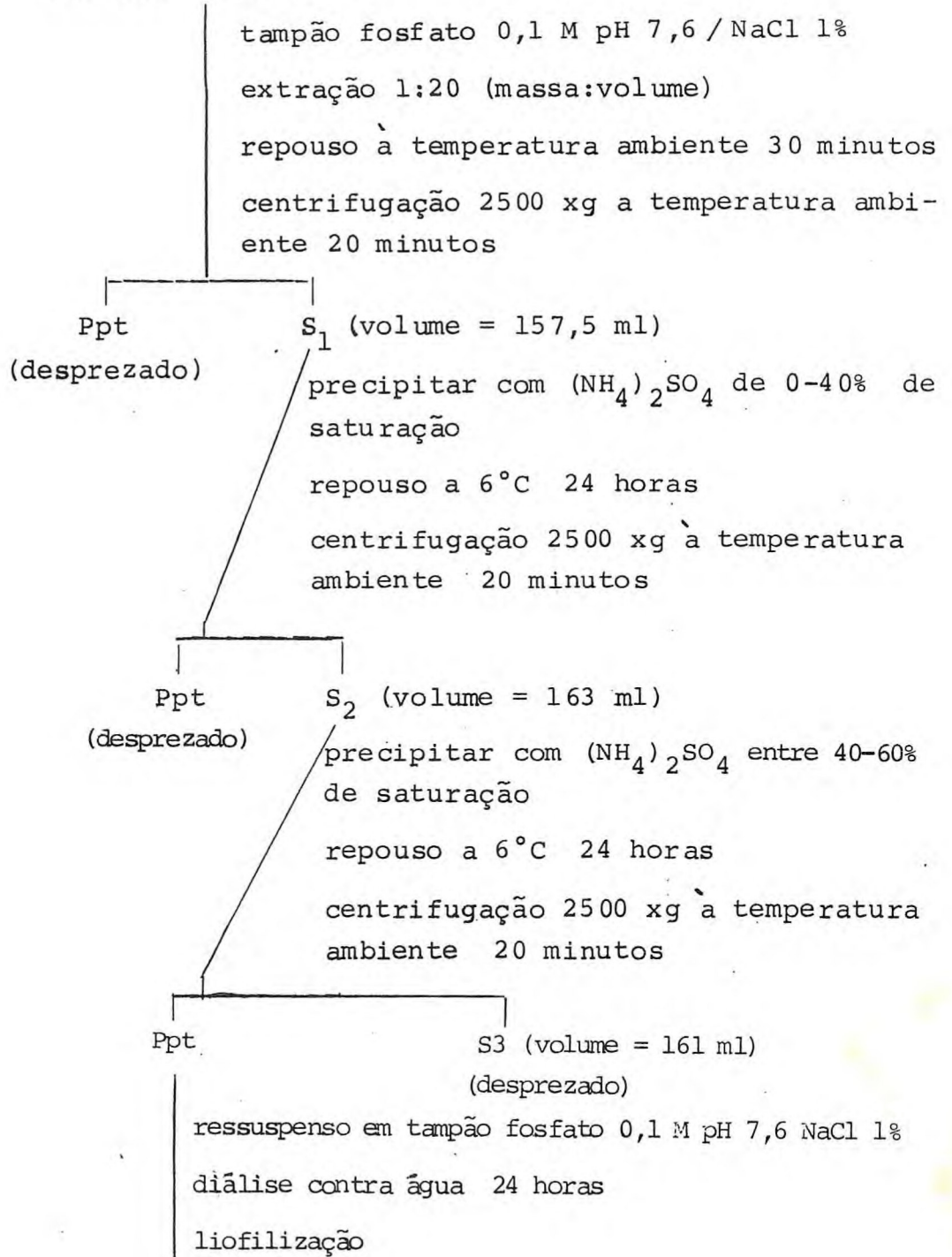


FIGURA 7

Esquema para obtenção de inibidores de *A. pavonina*, precipitáveis com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre 40-60% de saturação

Farinha delipidada



F 4060

TABELA V - Tabela de purificação

Fração	UI/gF	UI/mgP	Rendimento (%)	Purificação
ET	17.680	72	100	1
FIB	12.000	74	60,5	1,03
F 4060	13.520	128	76,5	1,8

5. Ação de ácidos sobre F 4060

5.a. Ação do ácido tricloroacético

Com a finalidade de se obter informações sobre o comportamento dos inibidores em meio ácido a fração F 4060 foi tratada com ácido tricloroacético nas concentrações de 2,5% e 5%. Foi observado a ocorrência de precipitação tanto com TCA 2,5% como 5%, sendo maior no último caso. De acordo com os dados mostrados na Tabela VI podemos observar que a diferença entre a atividade antitriptica das amostras em análise é de pouca significação, uma vez que a queda da atividade da F 4060 com 5% de TCA não chegou a 20%. O que acontece, no entanto, é uma baixa no que diz respeito ao rendimento, pois se levarmos em consideração os resultados obtidos para F 4060 (Tabela V) constata-se uma perda da atividade de inibitória em torno de 23%.

5.b. Ação do ácido acético

De acordo com a Tabela VII vê-se que cerca de 29% das proteínas são precipitadas por ácido e que cerca de 73% da atividade antitriptica permanece no sobrenadante ácido. Foi visto, no entanto, que a atividade específica decresce de 128 (Tabela V) para 94,8 indicando uma perda preferencial de inibidores.

6. Atividade antitriptica e concentração de proteínas em extrato total de folhas, vagem verde e cotilédones de vagem verde

A Tabela VIII mostra algumas características das

TABELA VI - Dados obtidos quando a F 4060 é submetida a tratamento com TCA

% TCA	UI/g de farinha	Intensidade da precipitação
0	10.400	-
2,5	9.750	+
5	8.580	++

TABELA VII - Dados obtidos quando a F 4060 é submetida a tratamento com ácido acético

Amostras	Proteína		Inibidor		
	mg/ml	Rendimento (%)	UI/ml	UI/mgP	Rendimento* (%)
Precipitado	0,270	28,6	4,25	15,7	12,1
Sobrenadante	0,675	71,4	64,0	94,8	72,9

* Calculado tomando como base o valor da atividade da F 4060 indicado na Tabela V.

TABELA VIII - Especificação das amostras

Amostras	Unidade	Peso fresco (g/unidade)	Peso seco (g/unidade)	Cor	Dimensão (cm)
Folhas					
bem jovem	1	0,0292	0,0078	marrom averm.	0,5 x 1,5
jovem	1	0,106	0,025	verde claro	1,6 x 3,0
adulta	1	0,1344	0,054	verde escuro	3,1 x 4,5
senescente	1	0,0644	0,28	amarela	2,0 x 3,5
Vagem verde					
(sem semente)	1	9,62	2,66	verde	30,0 x 1,7
Semente					
(vagem verde)	1	2,41	0,42	am. claro	1,0 x 1,0
Tegumento	-	1,28	0,29	amarelo	-
Cotilédones					
(vagem verde)	1	0,214	0,09	verde	-
Semente seca	1	1,36	-	vermelha e luzidia	1,0 x 0,9

amostras de folhas, vagem verde e cotilédones usados neste trabalho. Os dados de atividade antitriptica e concentração de proteínas em extrato total das referidas amostras são apresentados na Tabela IX, bem como também os dados de UI/mg de proteínas dessas mesmas amostras.

7. Cromatografia em DEAE-celulose (DEAE-Cel)

A F 4060 obtida por precipitação com sulfato de amônio a 40-60% de saturação, foi submetida a um fracionamento por cromatografia em troca iônica em DEAE-celulose. Na Fig. 8 podemos observar o gráfico do experimento onde evidenciamos a presença de duas frações. O primeiro pico foi eluído por meio de um gradiente retilíneo de ácido cítrico 0,01 a 0,2 M (pH 2,6 - 2,05). O segundo pico foi eluído, após o gradiente, por meio de uma solução de ácido cítrico 0,2 M / NaCl 1 M, pH 1,6. A atividade antitriptica dos efluentes foi determinada verificando-se que os dois picos apresentavam atividade contra tripsina.

Observou-se que havia um decréscimo na atividade específica quando se comparava as frações separadas pela cromatografia com a F 4060, como vemos na Tabela X. Após liofilização foi observado que a atividade específica era recuperada em parte porém, não chegando a atingir a atividade específica inicial da F 4060, que era de 128. Isto pode ser observado nesta mesma Tabela X. Foi verificado, que a F₁ de DEAE-celulose não se dissolvia totalmente em tampão fosfato 0,1 M pH 7,6 / NaCl 1%; mesmo a adição de uréia (2,8 M) até dissolução completa não levou à recuperação da atividade original da F 4060. Isto é provavelmente, um indício de que nesta etapa o inibidor está sendo inativado.

A Fig. 9 mostra o gráfico de uma cromatografia preparativa em DEAE-celulose. Este experimento foi feito com o objetivo de se obter material para a purificação posterior utilizando-se cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex C 50.

TABELA IX - Atividade antitriptica e concentraçãõ de proteínas em extrato total de folhas, vagem verde, cotilédones e tegumento da semente de vagem verde e de semente se ca de *A. pavonina*

Amostras	UI/g de tecido	mgP/g de tecido	UI/mgP
Folhas			
bem jovem	-	45,0	-
jovem	1,8	135,0	0,013
adulta	80,0	84,0	0,95
senescente	18,0	79,0	0,23
Vagem verde	4,9	85,0	0,058
Cotilédones			
(vagem verde)	8.950,0	185,6	48,2
Tegumento	-	180,0	-
Semente seca	17.680	245,5	72,0

FIGURA 8

Cromatografia em DEAE-celulose da F 4060

(-●-●-●-) $A_{280 \text{ nm}}$; (-○-○-○-) UI/ ml

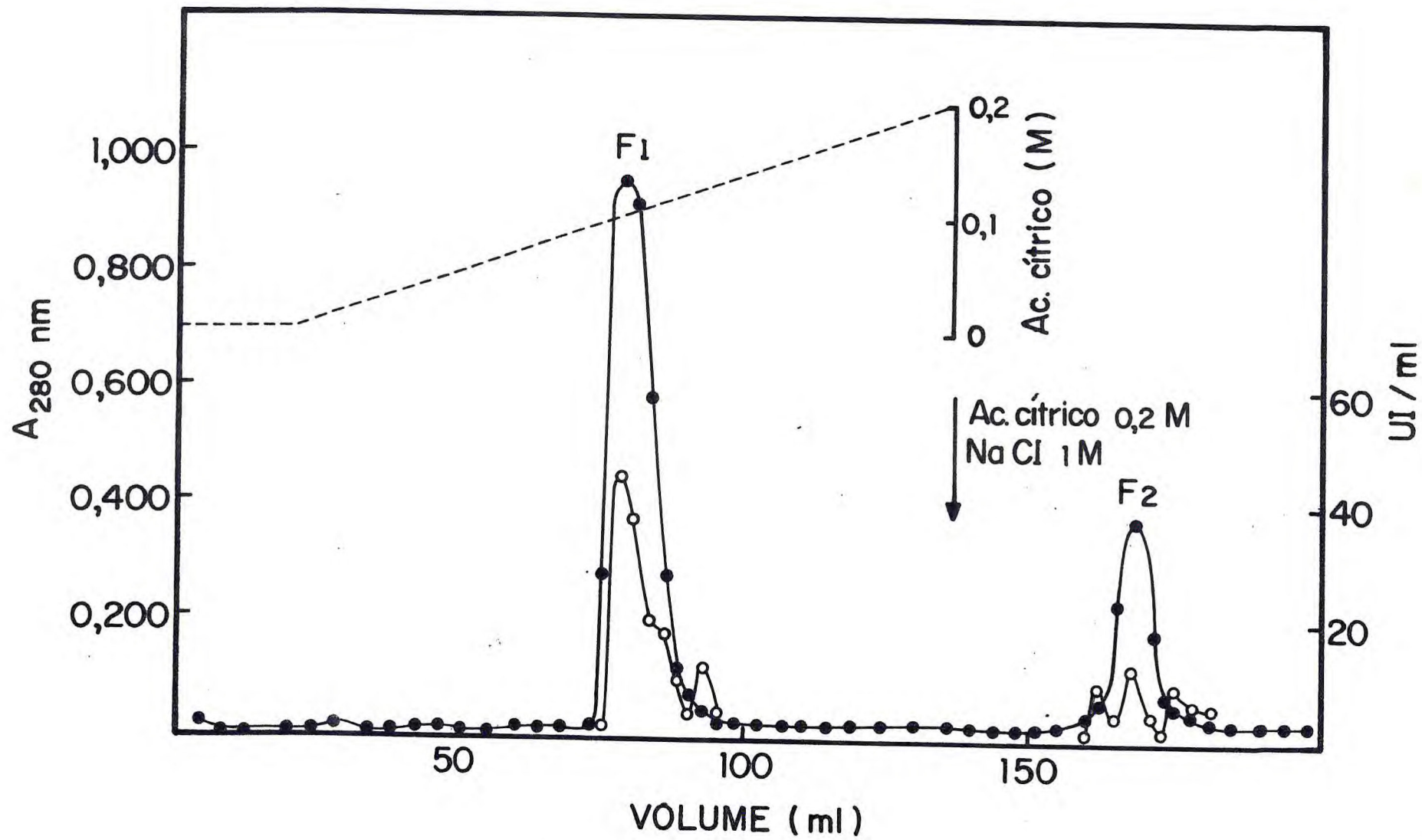


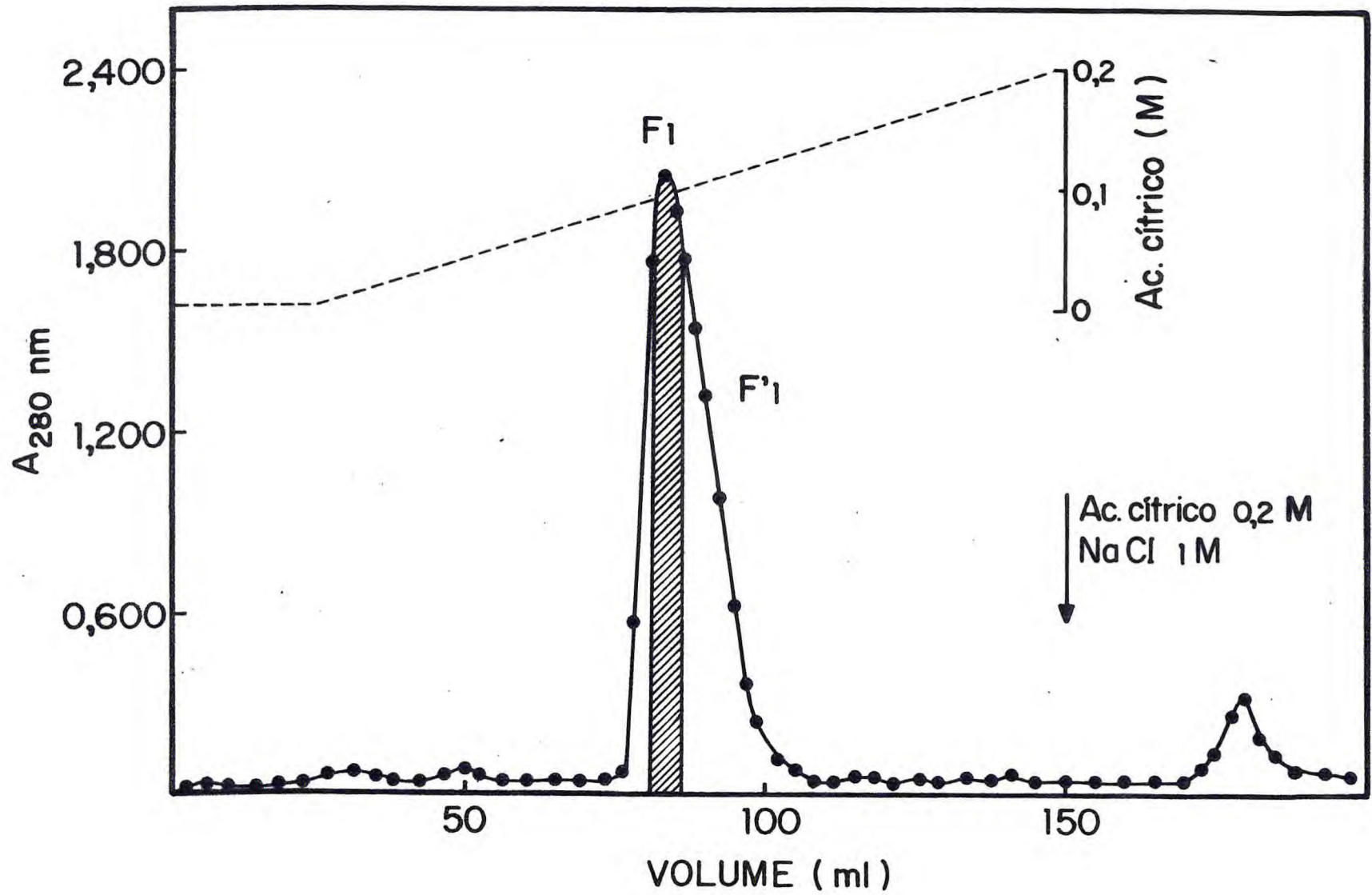
TABELA X - Resultados obtidos após cromatografia em DEAE-celulose

Amostras	A ₂₈₀ nm	UI/ml	Atividade específica (UI/mgP)
F 4060	0,810	104	128
F DEAE (dial. H ₂ O)	0,335	14,04	41,9
F DEAE (liofil.)	0,960	50	52
F DEAE (liof. + uréia 2,8 M)	-	-	63

FIGURA 9

Cromatografia preparativa em DEAE-celulose da F 4060

(-●-●-●-) $A_{280 \text{ nm}}$



A cromatografia foi realizada nas mesmas condições da cromatografia analítica usando-se, no entanto, uma quantidade bem maior de F 4060 (50 mg). Como podemos verificar a primeira fração eluída foi subdividida em duas partes, F_1 e F'_1 sendo que apenas F_1 após diálise em tampão acetato 5 mM pH 5,0 foi utilizada para cromatografia em SP-Sephadex C 50.

8. Cromatografia em SP-Sephadex C 50

Na Fig. 10 podemos observar o gráfico da cromatografia em SP-Sephadex C 50 de 5,0 ml de eluato correspondente a F_1 da cromatografia preparativa em DEAE-celulose. Podemos verificar que houve separação em duas frações. Um primeiro pico foi eluído com o próprio tampão de corrida (tampão acetato 5 mM pH 3,0), o segundo foi eluído através de um gradiente de concentração salina (tampão acetato 5 mM pH 5,0 / NaCl 0 - 1 M). Podemos verificar que ambos os picos apresentaram atividade contra tripsina. As frações foram dialisadas contra água destilada e posteriormente liofilizadas.

Na tentativa de se eliminar a etapa de fracionamento em DEAE-celulose, onde ocorre decréscimo da atividade específica, foram feitos experimentos partindo-se diretamente da F 4060 para fracionamento em SP-Sephadex C 50. Na Fig. 11 pode ser observado o gráfico de um desses experimentos. Como podemos verificar as 3 frações apresentam atividade inibitória contra tripsina, sendo que a correspondente ao 3º pico (F_2) que foi eluída com o gradiente de concentração salina, tem atividade maior que as demais. A atividade contra tripsina nesta F_2 liofilizada (FSP_2) foi determinada obtendo-se o valor de 132 UI/mg da fração para a atividade específica. Este resultado é comparável com o obtido para F_1 proveniente da F_1 de DEAE-celulose (Tabela XI). Nesta mesma tabela temos dados obtidos em diversas etapas de purificação do inibidor.

FIGURA 10

Cromatografia em SP-Sephadex C 50 da F₁ oriunda da cromatografia preparativa em DEAE-celulose

(-●-●-●-) A_{280 nm}; (-o-o-o-) UI/ml

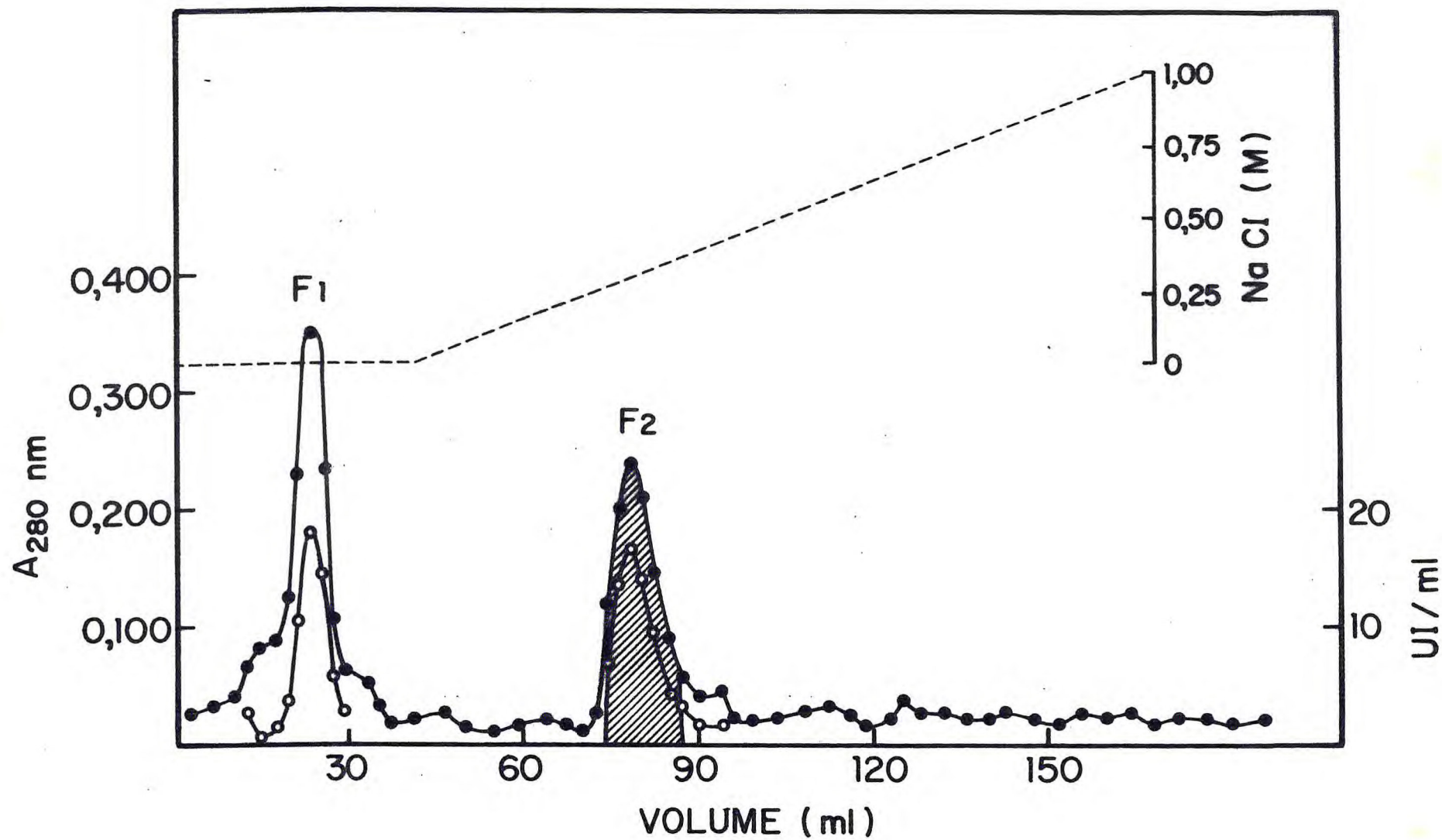


FIGURA 11

Cromatografia em SP-Sephadex C 50 da F 4060 (5 mg/ml) em tam-
pão acetato 5 mM pH 5,0.

(-●-●-●-) $A_{280 \text{ nm}}$; (-○-○-○-) UI/ml

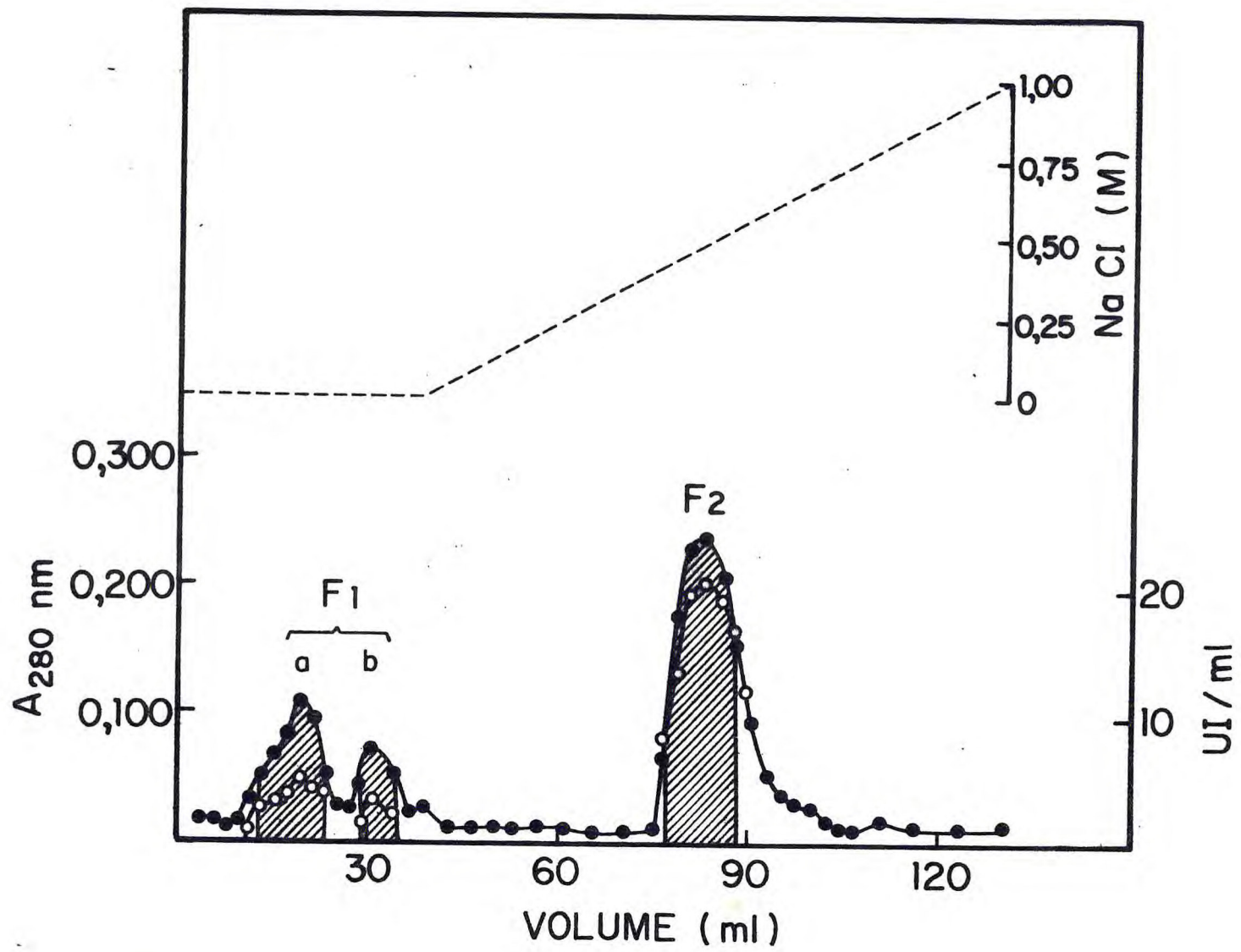


TABELA XI - Etapas de purificação do Inibidor de *Adenanthera pavonina*

Amostras	A _{280 nm}	Concentração (mg/ml)	UI/ml	Atividade específica UI/mg	Purificação
Extrato total	-	-	-	72	1
F 4060	0,810	1	104	128	1,8
FDEAE*	0,960	-	50	52	0,7
FSP ₁ **	0,300	0,1	11,57	115,7	1,6
FSP ₂ ***	-	0,1	13,2	132	1,83

* FDEAE liofilizada

** FDEAE após cromatografia em SP-Sephadex C 50 (pico 2)

*** F 4060 após cromatografia em SP-Sephadex C 50 (pico 2)

9. Cromatografia em Sepharose 4 B-anidro-tripsina

O inibidor obtido por cromatografia em SP-Sephadex, FSP₂, foi cromatografado em coluna de Sepharose 4 B-anidro-tripsina, equilibrada a pH 7,6.

Observando o perfil cromatográfico obtido (Fig. 12), verificamos a presença de duas frações, sendo que a atividade de inibitória contra tripsina é associada apenas à segunda fração, a qual foi eluída com HCl 0,01 M/NaCl 0,3 M a um pH de 4,0. A atividade específica, 55,8 nesta fração é bem menor do que a atividade específica do material isolado por cromatografia em SP-Sephadex, 132.

10. Eletrofocalização em placa de gel de poliacrilamida

As frações FIB, F 4060, FDEAE e FSP₁ foram examinadas por eletrofocalização em placas. Foi detectada em todas elas a presença de 6 bandas com atividade inibitória contra tripsina (Fig. 13), com os seguintes pontos isoelétricos:

FIB - 4,55; 4,65; 4,8; 4,95; 5,0 e 5,15

F 4060 - 4,55; 4,65; 4,8; 4,95; 5,0 e 5,1

FDEAE - 4,55; 4,6; 4,75; 4,95; 5,0 e 5,1

FSP₂ - 4,5; 4,65; 4,75; 4,90; 5,0 e 5,1

Como podemos observar, em todos os casos, existe uma semelhança acentuada entre as diversas frações ativas cujos pontos isoelétricos se encontram, em linha geral, na faixa de 4,5 a 5,1.

As Figs. 14 e 15 mostram placas de eletrofocalização com as mesmas amostras citadas acima e idênticos resultados, sendo que nestes casos as placas foram reveladas para atividade inibitória contra quimiotripsina e proteína, respectivamente.

FIGURA 12

Cromatografia de afinidade da FSP₂ em coluna de Sepharose
4 B-anidro-tripsina

(-●-●-●-) A_{280 nm}; (-○-○-○-) UI/ml

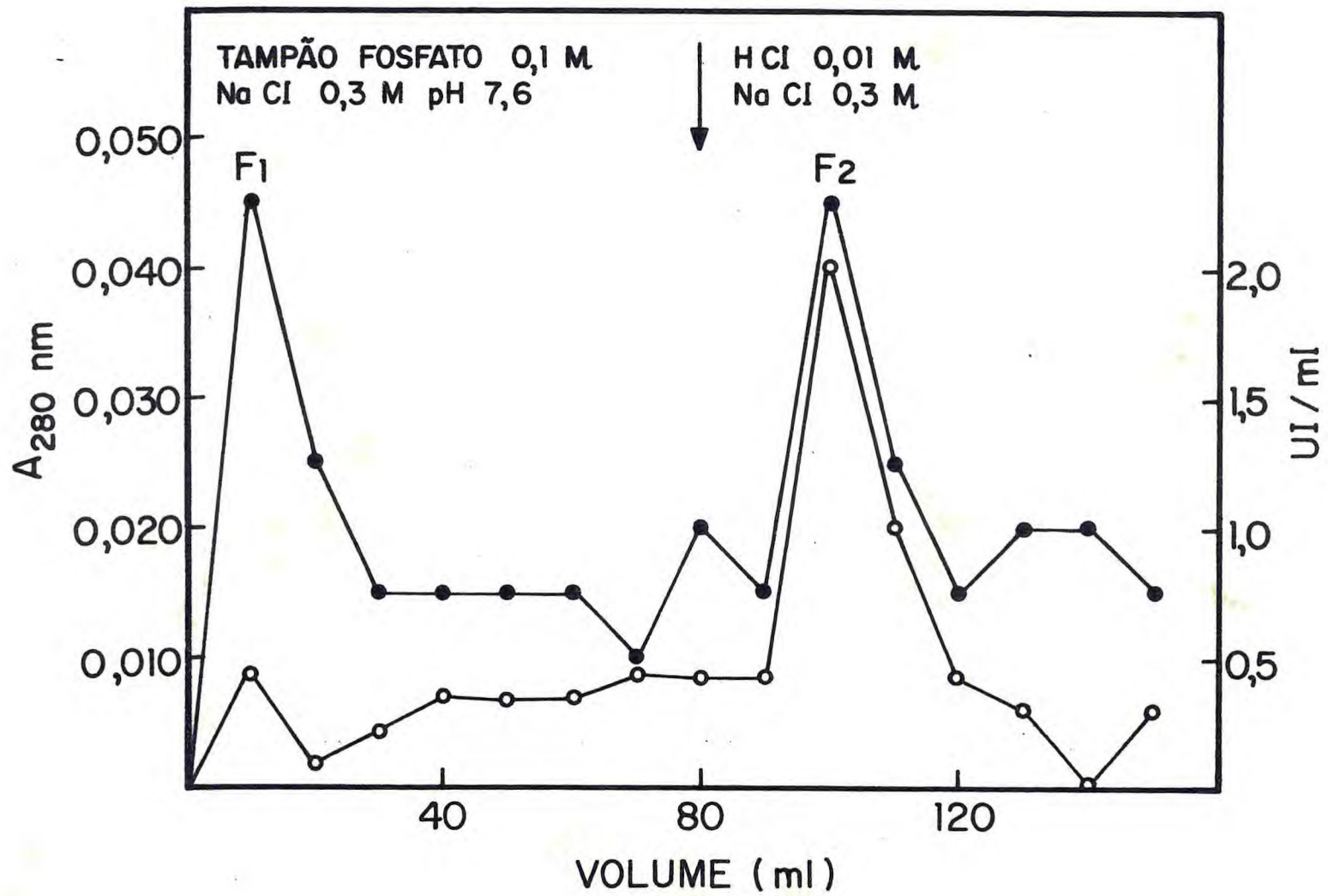


FIGURA 13

Eletrofocalização em placa de gel de poliacrilamida da
FIB (1), F 4060 (2), FBEAE (3) e FSP₂ (4); revelação para
inibidores de tripsina.

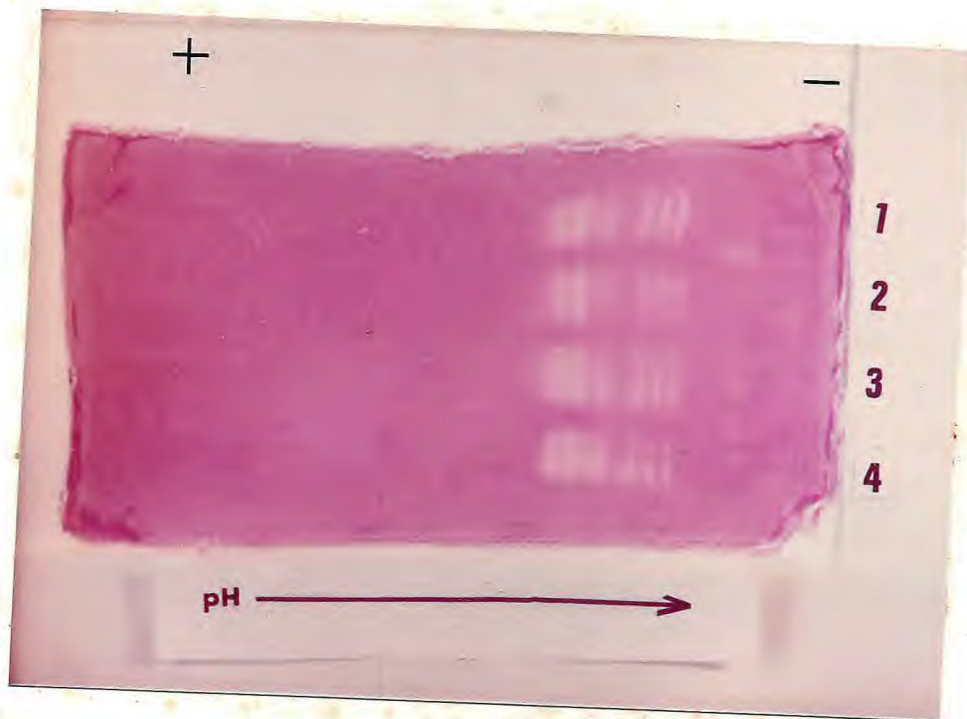


FIGURA 14

Eletrofocalização em placa de gel de poliacrilamida da
FIB (1), F 4060 (2), FDEAE (3) e FSP₂ (4); revelação para
inibidores de quimiotripsina.

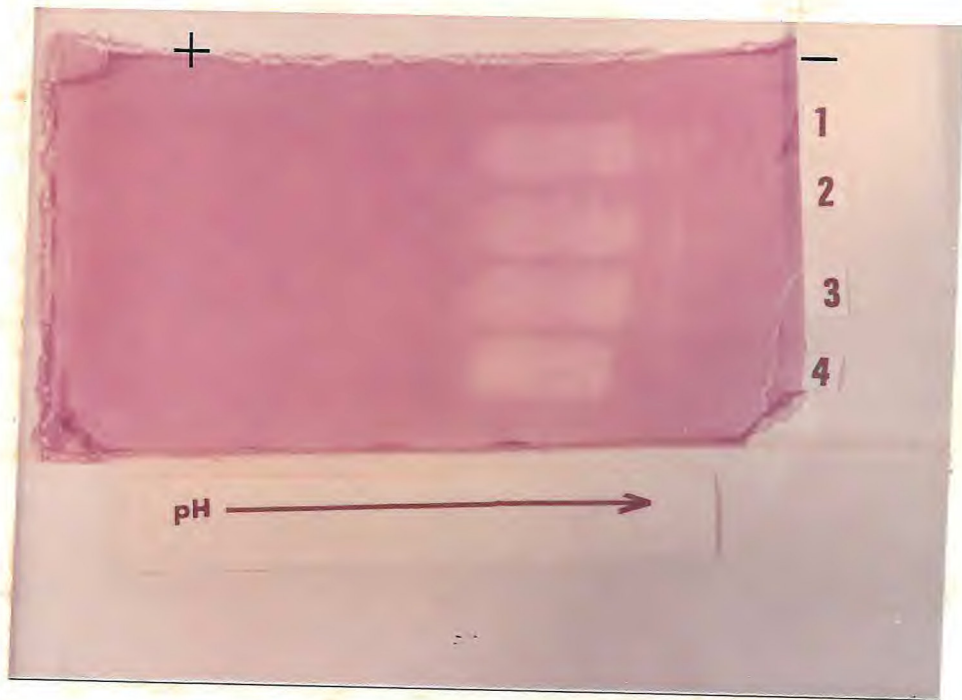


FIGURA 15

Eletrofocalização em placa de gel de poliacrilamida da FIB (1), F 4060 (2), FDEAE (3) e FSP₂ (4); revelação para proteínas.



Na Fig. 16 temos a mesma placa de eletrofocalização que a da Fig. 15, apresentando, no entanto, uma outra coloração devido ao fato da mesma ter sido colocada em contato com ácido acético 7,0%. Com relação a esta experiência (Figs. 15 e 16) foi observada uma mudança de coloração da placa de gel para azul tendo as bandas de proteína se tornado mais intensas. Foi verificado também, a existência de bandas adicionais numa região mais básica da placa.

11. Eletroforese em gel de poliacrilamida

11.a. Eletroforese a pH 8,1

O inibidor bruto, as frações precipitadas por sulfato de amônio, bem como as obtidas pelo fracionamento em DEAE-celulose (F₁) e em SP-Sephadex C 50 (FSP₁) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,1 (Fig. 17). Observamos a presença de uma banda fortemente corada por negro de amido cujo R_f é igual a $0,85 \pm 0,04$. Nesta mesma figura podemos observar para FDEAE a presença de uma fração protéica que não penetrou no gel. Na Fig. 18 podemos observar os resultados quando as mesmas frações, após eletroforese normal a pH 8,1, foram submetidas ao processo de visualização para inibidores de tripsina pelo método de URIEL e BERGES (46). Nesta experiência o R_f das amostras foi também calculado e observou-se, que a média destes era de $0,86 \pm 0,01$. Como podemos constatar existe uma boa correspondência entre as bandas coradas para proteína e para inibidor de tripsina. As F 6080 e F 80100 não apresentaram a banda característica dos inibidores, sugerindo que a banda de proteína de R_f 0,85 contém também proteínas inativas.

FIGURA 16

Eletrofocalização em placa de gel de poliacrilamida da FIB (1); f 4060 (2); FDEAE (3) e FSP₂ (4); revelação para proteínas e posterior tratamento com ácido acético 7%.

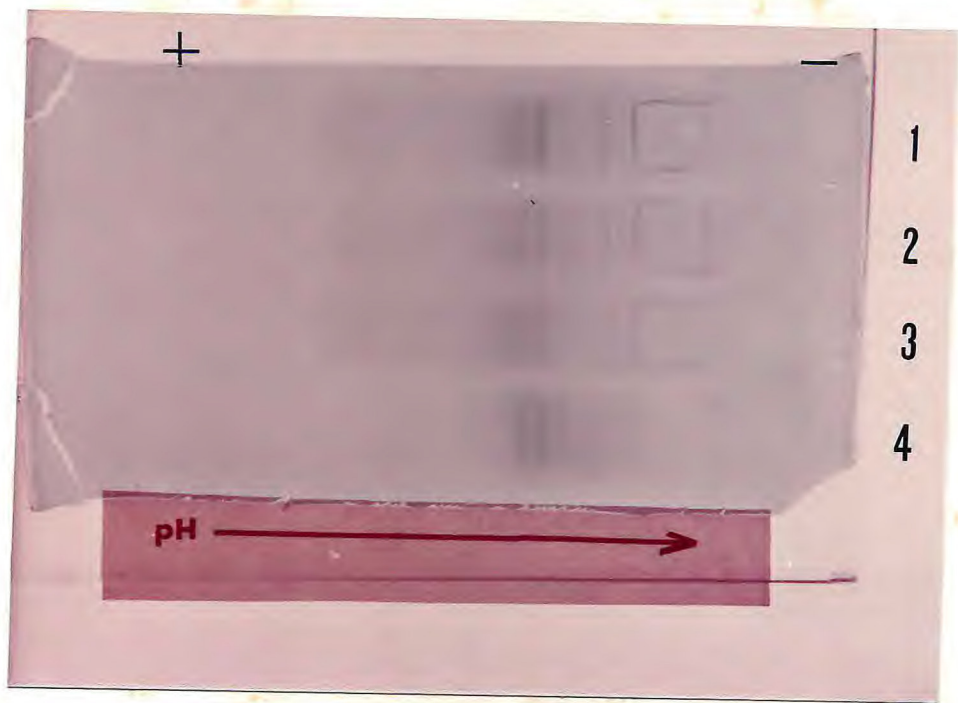


FIGURA 17

• Eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,1

a) FIB; b) F 040; c) F 4060; d) F 6080; e) F 80100;

f) FDEAE; g) FSP₁.

As bandas de proteína foram coradas com negro de amido.

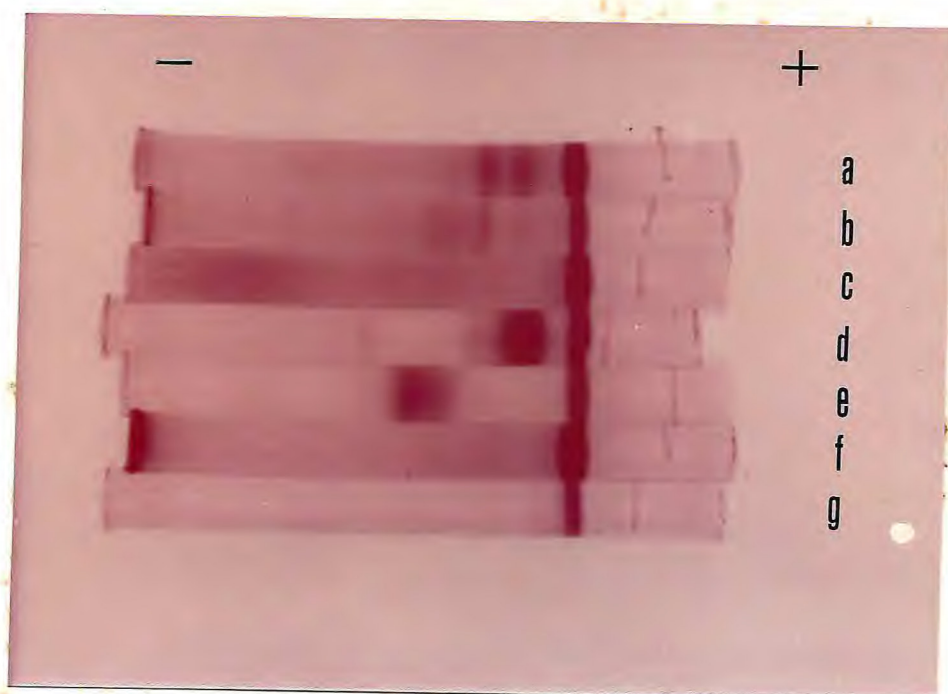


FIGURA 18

Eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,1 para visualização de inibidores de tripsina.

a) FIB; b) F 040; c) F 4060; d) F 6080; e) F 80100;
f) FDEAE; g) FSP₁.



FIGURA 19

Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS da FSP₂; revelação para proteínas (1), inibidor de tripsina (2) e inibidor de quimiotripsina (3).

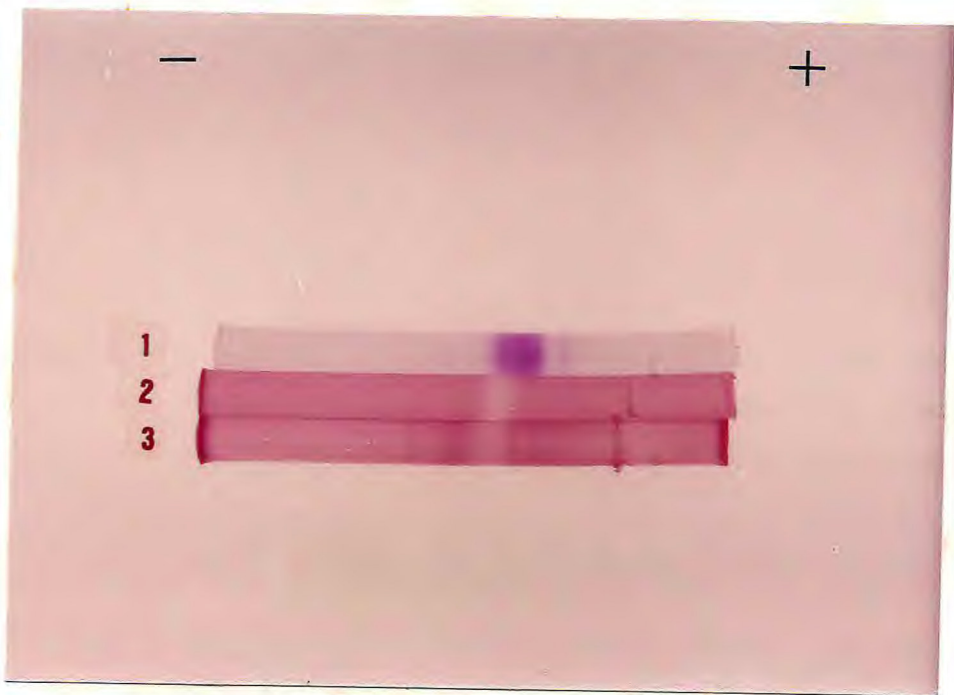


FIGURA 20

Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS do pico ativo (F_2) obtido em coluna de afinidade; revelação para visualizar inibidores de tripsina (1) e proteínas (2).

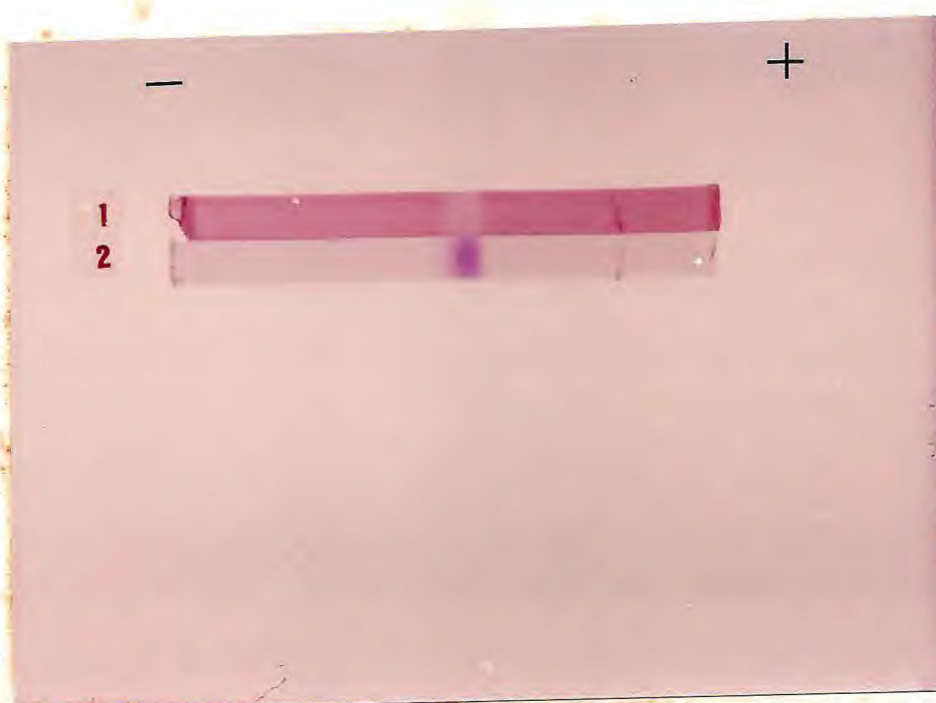
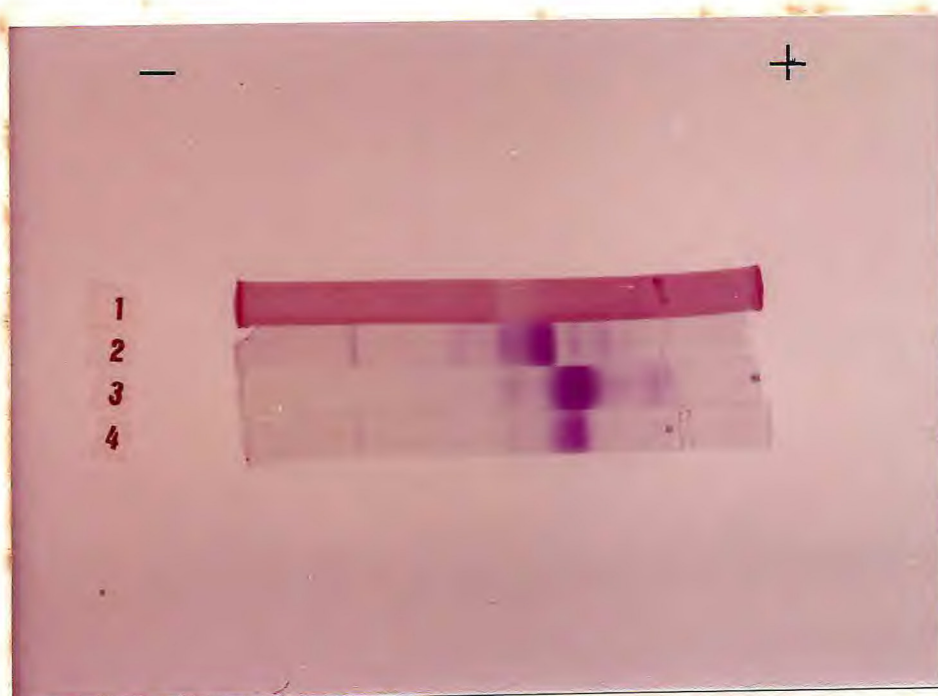


FIGURA 21

Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS da FSP₂. Tratamento com β -mercaptoetanol e uréia 8 M; revelação para inibidor de tripsina (1) e para proteínas (2, 3, 4).

- 2) FSP₂ com SDS
- 3) FSP₂ com SDS mais β -ME
- 4) FSP₂ com SDS, β -ME mais uréia 8 M



De acordo com os resultados mostrados na Fig. 21 podemos observar que o inibidor não é reduzido, nem mesmo pela ação da uréia 8 M. As bandas de proteínas, sugeridas como sendo as correspondentes ao inibidor (PM = 19.500 daltons), apresentam os seguintes valores relativos ao peso molecular: 20.700 daltons (Fig. 21-2), 20.800 daltons (Fig. 21-3) e 20.800 daltons (Fig. 21-4) respectivamente.

IV - DISCUSSÃO

O substrato normalmente empregado nas determinações de atividade antitriptica é a caseína 1%, no entanto, neste trabalho foi usado azo-caseína 1,5% e os resultados obtidos foram satisfatórios.

Os inibidores de proteinase em *Adenanthera pavonina* (carolina) estão localizados nas folhas, cotilédones (verdes e secos) e na vagem verde, sendo inexistente no tegumento. Sua concentração maior, no entanto, está na semente quiescente - 17.680 UI/g de farinha, como podemos observar na Tabela IX.

No que diz respeito a atividade inibitória e concentração de proteínas nas folhas, foi evidenciado o mesmo já citado em outros trabalhos, ou seja, ambas as características vão aumentando com o desenvolvimento da planta (53, 54). Em nosso trabalho foi observado, que quando ainda muito jovem (em torno de 0,5 x 1,5 cm) as folhas não apresentam capacidade de inibição. Com o desenvolvimento da planta, as proteínas foliares vão aumentando seu teor ao mesmo tempo que surge a capacidade para inibição, tendo esta capacidade inibitória atingido o seu climax quando a folha se encontra na fase considerada como "adulta" para então decrescer com a senescência (Tabela IX). Tal como nas folhas, os cotilédones também quando quiescentes, isto é, no estágio mais avançado de seu desenvolvimento, apresentam atividade inibitória contra tripsina bem mais significativa do que quando ainda na vagem verde (Tabela IX).

Os estudos feitos em relação à presença do inibidor de tripsina em vagem são relativamente recentes. AMBE e SOHONIE (55), 1956, estudando metabolismo em planta relataram a inexistência do inibidor em vagem de soja. BIRK e WALDMAN (56), 1965, também evidenciaram a ausência do inibidor em vagem de soja, porém não estabeleceram qual o estágio de desenvolvimento da vagem da qual foi extraído o inibidor. Experiências realizadas com

extrato de vagem de "cowpea" (53) evidenciaram a presença do inibidor na vagem, porém este se encontra presente apenas numa determinada fase de desenvolvimento da mesma, sendo totalmente inexistente no estágio final do desenvolvimento. Em nosso trabalho, também foi detectado a presença do inibidor em vagem verde, apesar de não termos estabelecido qual o estágio de desenvolvimento em que se encontrava (Tabela IX).

A termolabilidade da atividade inibitória em extratos da semente de *A. pavonina* contra tripsina foi observada, sendo esta completamente destruída quando submetida a 95°C durante uma hora sob condições ácida ou neutra (57). Tendo em vista o conhecimento deste fato, não foi feito este tipo de experiência, porém, o que foi observado no decurso do nosso trabalho, em relação a labilidade do inibidor foi que mesmo estando ele em condições habituais de armazenamento (-19°C) a sua capacidade de inibição era comprometida, havendo decréscimo desta no decorrer do tempo. Como podemos observar nas Tabelas V e VI ocorre perda em torno de 23% desta capacidade em ensaios realizados nas mesmas condições, em relação a F 4060.

No que diz respeito a atividade inibitória do ET e ET dializado (Tabela I) podemos observar que a recuperação, em termos percentuais, foi em torno de 86% porém nos resultados encontrados por SUMATHI e PATTABIRAMAN (57) a variação foi da ordem de 93,5 - 106,4%. Vale salientar, no entanto, que a diálise do ET, em nosso trabalho, foi feita com o mesmo tampão de extração, ou seja, tampão fosfato 0,1 M pH 7,6 / NaCl 1%, enquanto que no outro caso citado a diálise foi efetuada em água destilada.

Os inibidores isolados de *A. pavonina* apresentaram capacidade de inibição tanto para tripsina como para quimiotripsina (Figs. 13 e 14). Tal fato foi também evidenciado em estudos realizados por SUMATHI e PATTABIRAMAN (57) quando investigavam extrato bruto de sementes de "red wood", acácia, tamarindo, soja e outras espécies. Foi verificado que a mais alta atividade inibitória contra tripsina e quimio-

tripsina, entre as espécies em estudo, era encontrada em extratos de semente de "red wood" (*Adenanthera pavonina*). No entanto, a perda paralela das atividades antitriptica e antitrimiotriptica dessas sementes, durante o tratamento pelo calor, poderia sugerir que o mesmo inibidor é responsável pela inativação de ambas as enzimas (57).

De acordo com os dados contidos na Tabela V e Tabela XI, podemos observar que a atividade específica obtida na F 4060 foi apenas 1,8 vezes maior que a encontrada no ET, havendo um rendimento em torno de 77%. Durante a fase de estudos em cromatografia de troca iônica foi possível observarmos que na FDEAE ocorreu um decréscimo na atividade específica, que foi logo recuperada na fase seguinte do processo de purificação, ou seja, com a FSP₁ (Tabela XI). No entanto, nenhuma diferença significativa foi observada durante as preparações nos últimos estágios, no que se refere a atividade específica. É provável que a porção de atividade inibitória, em parte perdida na FDEAE, fosse devida a uma fração lábil, ou a uma insolubilização parcial da F 4060 no tampão de equilíbrio da coluna. Podemos também levar em consideração o fato da F₂ (Fig. 8), também com atividade inibitória contra tripsina, ter ficado retida na coluna de DEAE-celulose, só sendo eluída com ácido cítrico 0,2M/NaCl 1M, colocado após o gradiente de ácido cítrico 0,01 - 0,2 M. Na cromatografia de afinidade (Fig. 12) em Sepharose 4 B-anidro-tripsina, além da proteína ativa, uma proteína inativa foi eluída com o próprio tampão de equilíbrio. GENNIS e CATOR (58) trabalhando com sementes de *Vigna sinensis* var. "redbow", e utilizando cromatografia de afinidade, isolaram um inibidor de tripsina com peso molecular em torno de 8.000 daltons. Estudando-se os inibidores de tripsina em tubérculos de *Colocasia antiquorum* (59), foi obtido um inibidor de tripsina cujo peso molecular foi de 40.000 daltons. KUNITZ (5, 60) ao isolar um inibidor de soja, disse ser este uma proteína estável, do tipo globina e de peso molecular na faixa de 24.000 daltons. VENTURA e XAVIER (61) estudando inibidores de "black eyed pea" (*Vigna sinensis*) encon

traram um inibidor de tripsina com peso molecular de 1,0.000 daltons. Um inibidor de tripsina isolado de "navy beans" em estudos realizados por WAGNER e RIEHM (citado em 4) e tendo por base sua eluição em Sephadex G-75, dados de sedimentação e análise de aminoácidos, apresentou um peso molecular estimado em 23.000 daltons. Estudos recentes (62) evidenciaram um peso molecular de 24.000 daltons para um inibidor isolado de sementes de "red wood" por extração com HCl 0,01 M, cromatografia em gel, Sephadex G-100 e PAGE-SDS. O inibidor de tripsina isolado de *A. pavonina* conforme descrito no presente trabalho tendo por base estudos com PAGE-SDS, apresentou, tal como os inibidores citados acima, um peso molecular relativamente alto, em torno de 20.100 daltons (Fig. 20).

Os resultados obtidos por eletroforese com SDS foram contrários a hipótese inicial de trabalho que postulava, que quase 100% das proteínas existentes no material isolado eram inibidores. Esta hipótese foi sugerida diante dos resultados obtidos com a FSP₂, cuja atividade específica de 132 UI/mg, se aproximava da encontrada com a F 4060, isto é, 128 UI/mg.

Estudos eletroforéticos em gel de poliacrilamida e em fitas de acetato de celulose indicam que os inibidores são capazes de sofrer agregações, formando complexos (62). De acordo com os resultados encontrados na PAGE em presença de SDS, SDS com β -ME, SDS com β -ME e uréia 8 M (Fig. 21), este fato foi confirmado. A fração de inibidor obtido em SP-Sephadex C 50 (FSP₂) mostrou-se homogênea com relação ao peso molecular (PAGE-SDS, Figs. 19-2 e 20-1), porém mostrou micro-heterogeneidade em relação a carga (Focalização isoeletrica, Fig. 13).

Através de focalização isoeletrica em placa de gel de poliacrilamida foram detectadas seis bandas com atividade inibitória contra tripsina, cujos pontos isoeletricos, estão no intervalo entre 4,5 e 5,1. Nas Figs. 15 e 16 podemos observar frações de proteínas com comportamento igual

aos dos inibidores detectados na Fig. 13.

Se levarmos em consideração as eletroforeses com SDS (Figs. 19-1 e 21-2) e as focalizações isoelétricas (Figs. 13, 15 e 16) poderíamos perguntar: - Seriam de fato as diversas bandas de proteína, com atividade inibitória, iso**in**ibidores, provavelmente semelhantes em tamanho e diferindo nas cargas elétricas ou estariam proteínas contaminantes e inativas tão associadas ao inibidor que este as acompanharia durante o processo de deslocamento ao longo da placa de gel?

O inibidor presente na FSP₂ não sofre redução mesmo sob a ação do β -ME e do β -ME e uréia 8 M (Fig. 21). O que poderíamos supor é que as outras proteínas associantes e inativas, solubilizadas pela ação do SDS seriam reduzidas pela ação do β -ME, tendo em vista o decréscimo observado no peso molecular da fração de proteína com 17.900 para 13.500 daltons. A presença da uréia não ajudou de maneira significativa no processo em estudo. Analisando-se os resultados da Fig. 21 é de se pensar que este inibidor pode até ter pontes dissulfeto e pela ação do β -ME esta ponte ser rompida, mas não ocorrer fragmentação da cadeia. Poderá também haver uma só cadeia, de modo, que apesar de ocorrer rompimento da ponte -S-S- o inibidor permanece com a mesma mobilidade, sendo observada uma mesma posição nas diversas etapas de eletroforese com SDS efetuadas no decorrer do nosso trabalho.

V - CONCLUSÕES

- 1 - Os resultados de atividade antitriptica com a azo-caseína, usada como substrato para tais determinações, foram satisfatórios.
- 2 - O tampão fosfato 0,1 M pH 7,6 / NaCl 1% foi a solução extratora que apresentou melhor rendimento de inibidores de tripsina.
- 3 - Através da precipitação por sulfato de amônio a maior parte dos inibidores de tripsina precipita entre 40-60% de saturação.
- 4 - Os inibidores de proteases em *Adenantha pavonina* estão localizados nas folhas, cotilédones (verdes e secos) e na vagem verde, sendo inexistentes no tegumento. Sua maior concentração está na semente quiescente - 17.680 UI/g de farinha.
- 5 - Os inibidores detectados apresentam capacidade inibitória tanto para tripsina como para quimiotripsina.
- 6 - A labilidade da atividade inibitória contra tripsina é evidente, não apenas durante tratamento pelo calor, como também em condições habitualmente satisfatórias de armazenamento.
- 7 - A atividade inibitória e concentração de proteínas encontradas nas folhas vão aumentando com o desenvolvimento da planta para então decrescer com a senescência.
- 8 - O inibidor isolado de *A. pavonina* através de cromatografia em SP-Sephadex C 50 e Sepharose 4 B-anidro-tripsina, apresentou peso molecular em torno de 20.100 daltons por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS.
- 9 - A fração de inibidor ativa obtida em SP-Sephadex C 50 (FSP₂) mostrou-se homogênea na eletroforese com SDS,

porém na focalização isoelétrica mostrou micro-heterogeneidade, sendo detectadas seis bandas com atividade inibitória contra tripsina, cujos pontos isoelétricos estão no intervalo de 4,5 e 5,1.

- 10 - O inibidor presente na FSP₂ não sofre redução com β -ME, mesmo em presença de uréia 8 M.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. ANGELO, A. I. St., ORY, R. L. and HANSEN, H. I. 1969. Purification of acid proteinase from *Cannabis Sativa* L. Phytochem. 8:1873-1877.
2. DECHARY, J. M. 1970. Seed proteases and protease inhibitors. Econ. Bot. 24:113-122.
3. VOGEL, R., TRAUTSCHOLD, I. and WERLE, E. 1968. Natural proteinase inhibitors. Academic Press, New York.
4. 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.
5. KUNITZ, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. J. Gen. Physiol., 30:291-310.
6. KUNITZ, M. 1947. Isolation of a crystalline protein compound of trypsin and of soybean trypsin inhibitor. J. Gen. Physiol., 30:311-320.
7. LIENER, I. E. 1962. Toxic factors in edible legumes and their elimination. Amer. J. Clin. Nutr. 11:281-289.
8. LASKOWSKI, M. and LASKOWSKI, Jr. M. Naturally occurring trypsin inhibitors in Adv. Prot. Chem. (C. Anfinsen, M. Anson, K. Barley, and J. Edsall. Eds.), 9:203-242, Academic Press, New York.
9. PERLMANN, G.E. and LORAND, L. 1970. Proteolytic Enzymes in Methods in Enzymology, vol. XIX:853-862. Academic Press, New York and London.
10. WEDER, J. K. P. 1978. Occurrence of proteinase inhibitors in *Mimosoideae*. Z. Pflanzenphysiol. 90: 285-291.
11. RICHARDSON, M. 1977. The proteinase inhibitors of plants and micro-organisms. Phytochemistry, 16: 159-169.

12. PUSZTAI, A. 1967. Trypsin inhibitors of plant origin, their chemistry and potential role in animal nutrition. Nutr. Abstr. Rev. 37(11):1-9.
13. XAVIER, F. J. and NEGREIROS, A. N. M. 1979. Distribution of proteinase inhibitors in *Vigna sinensis* seeds. Z. Pflanzenphysiol. 95:423-430.
14. SOHONIE, K. and BHANDARKAR, A. P. 1954. Trypsin inhibitors in Indian foodstuffs: Part I - Inhibitors in vegetables. J. Sci. Industr. Res., 13 B; 500-503
15. LASKOWSKI, M. Jr., and SEALOCK, R. W. 1971. Protein proteinase inhibitors - molecular aspects. In: The Enzymes. Ed. by P. D. Boyer, 3rd. ed., 3:375-437, Academic Press New York.
16. RYAN, C. A. 1973. Proteolytic Enzymes and their inhibitors in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 24: 173-193.
17. SPICKETT, R. G. W. 1971. Proteolytic enzymes. Chem. Ind. 83-94.
18. SIFFERT, O., EMÖD, I. and KEIL, B. 1976. Interactions of clostripain with natural trypsin inhibitors and its affinity labelling by N-p-nitrobenzyloxycarbonyl arginine chloromethyl ketone. FEBS Lett. 68(1):114-119.
19. STEVENS, F. C., WUERZ, S. and KRAHN, J. 1974. Structure-Function relationships in Lima bean protease inhibitor. Bayer-Symposium V "Proteinase-Inhibitors". Ed. by H. Fritz, J. L. Greene and E. Truscheit, pp. 344-354. Springer Verlag, Berlin and New York.
20. PUSZTAI, A. 1968. General properties of a protease inhibitor from the seeds of kidney bean. Eur. J. Biochem. 5:252-259.
21. IKENAKA, T., ODANI, S. and KOIDE, T. 1974. Chemical structure and inhibitory activities of soybean proteinase-inhibitors. Bayer-Symposium V "Proteinase-inhibitors". Ed. by H. Fritz, J. L. Greene and E. Truscheit, pp. 325-343. Springer Verlag, Berlin and

New York.

22. BIRK, Y. 1974. Structure-Activity relationships of several trypsin and chymotrypsin inhibitors from legume seeds. Bayer-Symposium V "Proteinase-inhibitors". Ed. by H. Fritz, J. L. Greene and E. Truscheit, pp. 355-361. Springer Verlag, Berlin and New York.
23. RYAN, D. S. and FEENEY, R. E. 1974. The inhibition of catalitically 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.
24. BLOW, D. M., JANIN, J. and SWEET, L. M. 1974. Mode of action of soybean trypsin inhibitor (Kunitz) as a model for specific protein - protein interactions - Nature, 249(5452):54-57.
25. SWEET, R. M., WRIGHT, H. T., JANIN, Jr., CHOTHIA, C. H. and BLOW, D. M. 1974. Crystal structure of the complex of porcine trypsin with soybean trypsin inhibitors (Kunitz) at 2.6 Å resolution. Biochemistry, 13(20):4212-4228.
26. LIENER, I. 1976. Legume toxins in relation to protein digestibility - A review. J. Food Science, 14:1076-1081.
27. LIENER, I. 1979. Significance for humans of biologically active factors in soybeans and other food legumes. J. Am. Oil Chemists. Soc., 56:121-129.
28. MAYER, A. M. and SHAIN, Y. 1974. Control of seed germination in Ann. Rev. Plant. Physiol. 25:167-193.
29. 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.

30. XAVIER, F. J. 1973. Trypsin inhibitors during germination of *Vigna sinensis* seeds. Physiol. Plant. 28:149-154.
31. SHAIN, Y. and MAYER, A. M. 1965. Proteolytic enzymes and endogenous trypsin inhibitor in germinating lettuce seeds. Physiol. Plant., 18:853-859.
32. KIRSI, M. and MIKOLA, J. 1971. Occurrence of proteolytic inhibitors in various tissues of barley. Planta 96:281-291.
33. RYAN, C. A. 1978. Proteinase inhibitors in plant leaves: A biochemical model for pest - induced natural plant protection. Trends Biochem. Sci. 9:148-150.
34. GREEN, T. R., RYAN, C. A., 1972. Wound - induced proteinase inhibitor in plant leaves. A possible defense mechanism against insects. Amer. Ass. Adv. Sci., 175:776-777.
35. MCFARLAND, D. and RYAN, C. A. 1974. Proteinase inhibitor-inducing factor in plant leaves. A phylogenetic survey. Plant. Physiol., 54:706-708.
36. RYAN, C. A. 1974. Wound-induced accumulation of proteinase inhibitor I in tomato leaves. Bayer-Symposium V "Proteinase inhibitor". Ed. by H. Fritz, J. L. Greene and E. Truscheit, pp. 667-673. Spring Verlag, Berlin and New York.
37. CASTRO, A. 1979. A cabra. Ed. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Fortaleza, 376 pp.
38. BRAGA, R. 1976. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. 3a. edição comemorativa ao II Congresso Brasileiro de Florestas Tropicais. Mossoró - 18/24 de julho de 1976.
39. MOREIRA, R. A., XAVIER, J. F., AINOUS, I. L., LIMA, M. G. S., AQUINO, A. M., BENEVIDES, N. M. B. e REINALDO, H. M. C. 1979. 8a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica. Caxambu. Publicado no Livro de Resumos.

40. GOAD, L. J. 1963. Ph. D. Thesis. University of Manchester,
41. KAKADE, M. L., SIMONS, N. and LIENER, I. E. 1969. An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. Cer. Chem. 46:518-526.
42. GOA, J. 1953. A microbiuret method for protein determination of total protein in cerebrospinal fluid. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 5:218-222.
43. GUSTAFSON, G. and RYAN, C. A. 1976. Specificity of protein turnover in tomato leaves. Accumulation of proteinase inhibitors induced with the wound hormone, PHF. J. Biol. Chem. 251(22):704-710.
44. XAVIER, F. J. 1979. Relatório ao Deutscher Akademischer Austauschdienst.
45. CLARKE, J. T. 1964. A simplified "disc" (polyacrylamide gel) eletrophoresis. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121:428-436.
46. URIEL, J. and BERGER, J. 1968. Characterization of natural inhibitors of trypsin and chymotrypsin by electrophoresis in acrylamide-agarose gels. Nature, 218:578-580.
47. KAISER, K. P. and BELITZ, H. D. 1971. Proteinaseinhibitoren in lebensmitteln. Vorkommen un isolierung von trypsin und chymotrypsininhibitoren in kaintofflen. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebens., 1:1-7.
48. XAVIER Filho, J. and MOREIRA, R. A. 1978. Visualization of proteinase inhibitors in SDS-polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 84:296-303.
49. WEBER, K. and OSBORN, M. 1964. The realiability of molecular weight determinations by sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis, J. Biol. Chem., 244:4406-4412.

50. AWDEH, Z. L., WILLIAMSON, A. R. and ASKONAS, B. A. 1968. Isoelectric focusing polyacrylamide gels and its application to immunoglobulins. Nature, 219:66-67.
51. XAVIER, F. J. and SOUSA, F. D. N. 1979. Isolation and characterization of a trypsin inhibitor from *Vigna sinensis* seeds. Biol. Plant. (Praha). 21:119-126.
52. REISNER, A. H., NEMES, P. and BUCHOLTZ, C. 1975. The use of Coomassie Brilliant Blue G 250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 64:509-516.
53. RACUSEN, C. and FOOTE, M. 1970. And endopeptidase of bean leaves. Can. J. Bot. 48:1017-1021.
54. CARASCO, J. F. and XAVIER, F. J., 1981. Sequential expression of trypsin inhibitors in developing fruit of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Ann. Bot. 47:259-266.
55. AMBE, K. S. and SOHONIE, K. J., 1956. Trypsin inhibitor in plant metabolism. Experientia, 12:302-3.
56. BIRK, Y. and WALDMAN, M. 1965. Amylotic, trypsin-inhibiting and urease-activity in three varieties of soya bean and in soya bean plant. Qual. Pl. Mater. Veg 12:199-209.
57. SUMATHI, S. and PATTABIRAMAN, T. N. 1976. Natural Plant enzyme inhibitors: Part II - Protease inhibitors of seeds. Indian J. Biochem. Biophys. 13:52-56.
58. GENNIS, L. S. and CANTOR, C. R. 1976. Double-headed protease inhibitors from black-eyed peas. I. Purification of two new protease inhibitors and the endogeneous protease by affinity chromatography. J. Biol. Chem. 251:734-740.
59. SUMATHI, S. and PATTABIRAMAN, T. N. 1979. Natural plant enzyme inhibitors. VI. Studies on trypsin inhibitors of *Colocasia antiquorum* tubers. Biochem. Biophys. Acta. 566:115-127.

60. WANG, L. C. 1971. Isoelectric point differences in commercial soybean trypsin inhibitor. Amer. Ass. Cer. Chem. 48:303-312.
61. VENTURA, M. M. and XAVIER Filho, J. 1966. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vigna sinensis*). I. Purification and characterization. An. Acad. Bras. Ciências. 38(3/4):553-566.
62. PRABHU, K. S. and PATTABIRAMAN, T. N. 1979. Natural plant enzyme inhibitors. Isolation and characterisation of a trypsin/chymotrypsin inhibitor from Indian red wood (*A. pavonina*) seeds. J. Sci. Food Agric. 31:967-980.

VII - COMUNICAÇÃO A CONGRESSO

29

INIBIDORES DE TRIPSINA EM Adenantha pavonina (carolina).
ESTUDOS PRELIMINARES.

GERUZA MARIA CALDAS-MAIA¹ e J.X.PILHO²

1) Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFRN.

2) Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.

Sementes quiescentes (livres de tegumento) de Adenantha pavonina (carolina) foram analisadas quanto ao seu conteúdo de inibidores de tripsina. A extração de inibidores foi feita utilizando-se tampão fosfato 0,1 M pH 7.6 em NaCl 1%. Azo-Caseína, com absorção máxima a 44 Onm, foi utilizada como substrato para detectar a capacidade de inibição contra tripsina. Através de ensaios de atividade foi estabelecido, que para testar a atividade antitriptica, utilizando-se Azo-Caseína, a tripsina de veria estar numa concentração de 10 µg/ml e o substrato a 1,5 g/l em tampão fosfato 0,1 M pH 7.6. Nestas condições os gráficos de atividade não se apresentam retilíneos, razão porque usou-se o artifício, sugerido por Kakade e Liener (1), pelo qual as absorbâncias obtidas em 44 Onm são elevadas a potência 3/4; obtém-se, assim, um gráfico linear característico. Definir-se uma unidade de atividade triptica (TU) como sendo o aumento de 1 unidade de absorbância em 44 Onm na mistura de reação, sob condições de ensaio. A atividade antitriptica é definida como o número de unidades de tripsina inibida. Quando o extrato total (ET) de farinha de sementes de Adenantha pavonina foi submetido a precipitação com sulfato de amônio, observou-se que a maior parte da atividade antitriptica precipitava entre 40-60% de saturação. Esta atividade é facilmente comprometida. A perda da capacidade de inibição é observada não apenas pela ação do calor (2), mas, também quando a amostra se encontra estocada a temperaturas baixas (-19°C) foi possível demonstrar a existência de atividade antitriptica, não apenas nas sementes quiescentes, mas também em outras partes da planta, tais como folhas, vagens e cotilédones de vagem verde. No caso de folhas e vagens esta atividade parece ser inespecífica.

(1) Kakade, M.M. e Liener, I.E. - An Evaluation of Natural vs. Synthetic Substrates for Measuring the Antitryptic activity of Soybean Samples. Breadmaking with glycolipids, *JF* vol.46 September, 1969 pp.518-526.

(2) S.Sumatni & I.N.Pattabiraman - Natural Plant Enzyme Inhibitors of Seeds. *Indian Journ of Biochemistry & Biophysic* - vol.13, March 1976, pp. 52-56.

AUÁLIOS FINANCEIROS DA CAPES/PICD

I Reunião Regional da Sociedade Brasileira de Bioquímica. Fortaleza - 22-24/9, 1980. Livro de Resumos.