



LUCIANA DI CIERO TOLEDO LEME

INIBIDORES DE PROTEINASE DE SEMENTES  
DE *Bauhinia variegata*. CARACTERIZAÇÃO  
FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA

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

9701168

|                                                                                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Este exemplar corresponde à redação final<br>da tese do(a) candidato(a)<br><i>Luciana Di Ciero Toledo Leme</i><br>e aprovada pela Comissão Julgadora. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

3/12/96 *Sergio Marangoni*

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Marangoni

Campinas - SP

1996



|             |                                                                  |
|-------------|------------------------------------------------------------------|
| UNIDADE     | BC                                                               |
| N. CHAMADA: |                                                                  |
| IP/Unicamp  |                                                                  |
| Le 542i     |                                                                  |
| V. Ex.      |                                                                  |
| NUMERO DO   | 29504                                                            |
| PROG        | 281/97                                                           |
| C           | <input type="checkbox"/> 0 <input checked="" type="checkbox"/> X |
| PREÇO       | R\$ 11,00                                                        |
| DATA        | 18/01/97                                                         |
| NHº         | CPD                                                              |

CM-00096665-5

L542i

Leme, Luciana Di Ciero Toledo

Inibidores de proteinase de sementes de *Bauhinia variegata* : caracterização físico-química e atividade biológica / Luciana Di Ciero Toledo Leme. --Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientadores: Sérgio Marangoni, Cláudio Augusto Machado Sampaio.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Inibidores enzimáticos proteolíticos 3. Pata de vaca. 3. Serina proteinases. 4. Sequência de aminoácidos. I. Marangoni, Sérgio. II. Sampaio, Cláudio Augusto Machado. III. Universidade Estadual de Campinas. . Instituto de Biologia. IV. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 03 de Dezembro de 1996

**BANCA EXAMINADORA:**

**TITULARES:**

Prof. Dr.: Sergio Marangoni Sergio Marangoni  
Assinatura

Prof. Dr.: Breda Oliveira F. Breda Oliveira F.  
Assinatura

Prof. Dr.: Hiroshi Aoyama Hiroshi Aoyama  
Assinatura

Prof. Dr.: Aparecida Sade Tanaka Aparecida Sade Tanaka  
Assinatura

Prof. Dr.: Waldemir C. Spurbren Waldemir C. Spurbren  
Assinatura

**SUPLENTE:**

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_  
Assinatura

## AGRADECIMENTOS

- À FAPESP pela bolsa de pós-graduação nível Doutorado concedida.
- Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni, pela dedicação e orientação deste trabalho.
- Ao Professor Dr. Benedito de Oliveira por valiosos conselhos e observações sempre pertinentes.
- Ao professor Dr. José Camillo Novello pelas análises de seqüência.
- De forma especial ao Marcos Hikari Toyama, aluno de pós-graduação (nível Doutorado) e à todos os docente, funcionários e pós-graduandos do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia UNICAMP que direta ou indiretamente, auxiliaram-me na realização deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Cláudio Augusto Machado Sampaio do Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina, por todo estímulo e co-orientação deste trabalho.
- À Prof. Dra. Maria Luiza Vilella Oliva, do Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina, por acreditar que este trabalho seria possível.
- Ao Ricardo Torquato do Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina por me ensinar os primeiros passos deste trabalho.,
- À Aparecida, Isabel, Manoel, Sônia, Márcia e demais funcionários do Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina, pelo auxílio prestado em todas as fases deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Jürgen K. P. Weder do Institut für Lebensmittelchemie da Technische Universität München, pela acolhida em seu laboratório.
- À Kerstin Böhland, à Silvia Müller à Sabine Hinkers pelas horas de conforto e amizade quando a saudade da família apertava.
- Ao Prof. Dr. Peter Köhler, do German Research Center for Food Chemistry, pelo sequenciamento dos N-terminais das moléculas estudadas.

- Aos meus pais, especialmente à minha mãe que em todos os momentos estiveram ao meu lado, incentivando-me e cuidando de minhas filhas para que fosse possível eu realizar esta jornada tranquilamente.

- Ao meu marido pelo incentivo e compreensão.

- Ao Engenheiro Agrônomo Francisco José do Nascimento Kronka, do Instituto florestal do Estado de São Paulo pela gentileza em fornecer as sementes de *Bauhinia variegata* necessárias para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

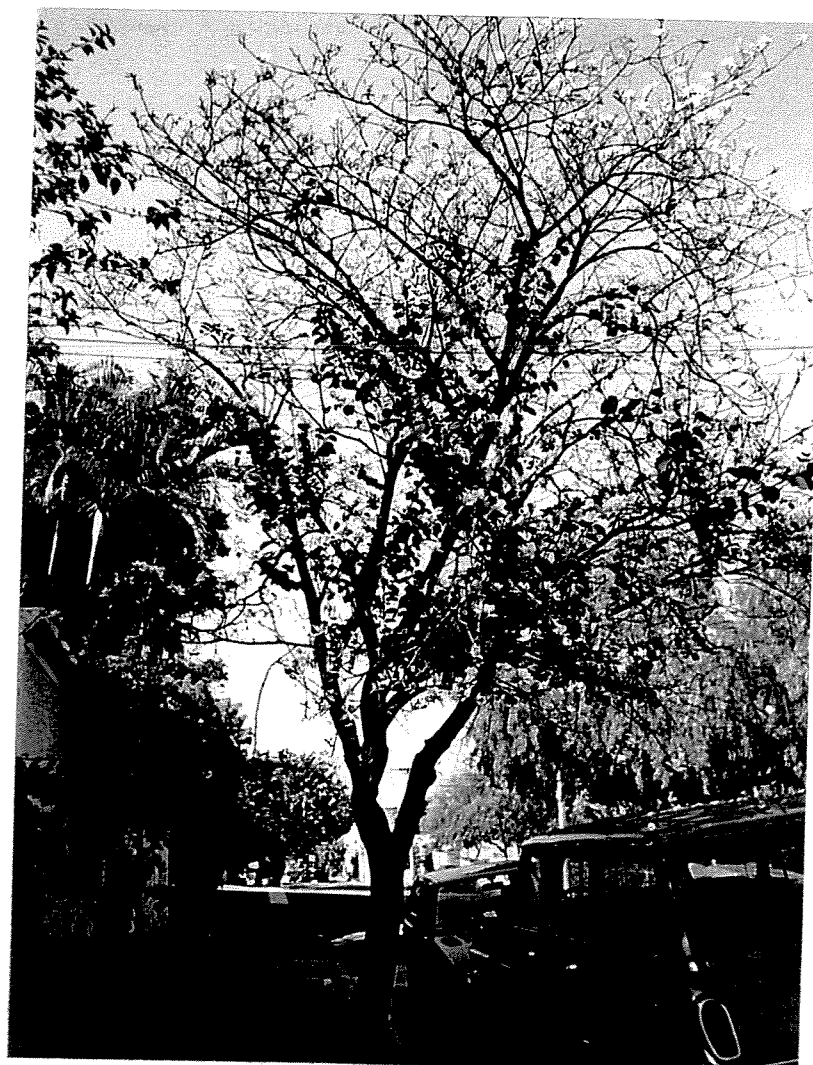
|                                                         |    |
|---------------------------------------------------------|----|
| Agradecimentos                                          | 2  |
| Índice                                                  | 4  |
| Abreviaturas                                            | 5  |
| Abreviaturas para Aminoácidos                           | 6  |
| Exemplar de <i>Bauhinia variegata</i> variedade cândida | 7  |
| Exemplar de <i>Bauhinia variegata</i> variedade lilás   | 8  |
| 1. Introdução                                           | 9  |
| 2. Objetivos                                            | 25 |
| 3. Materiais e Métodos                                  | 26 |
| 3.1. Material Vegetal                                   | 26 |
| 3.2. Reagentes, Enzimas e Substratos                    | 26 |
| 3.3. Métodos                                            | 27 |
| 4. Resultados                                           | 49 |
| 5. Discussão                                            | 77 |
| 6. Resumo                                               | 90 |
| 7. Summary                                              | 91 |
| 8. Bibliografia                                         | 92 |

## ABREVIATURAS

|              |                                                                                             |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| APANA        | acetil-fenilalanina-arginina-p-nitroanilida                                                 |
| BAPNA        | N-benzoil-L-arginina-p-nitroanilida                                                         |
| BCT          | $\alpha$ -quimotripsina de pâncreas bovino                                                  |
| BT           | tripsina de pâncreas bovino                                                                 |
| BTEE         | N-benzoil-L-tirosina-etil-ester                                                             |
| BTPNA        | N-benzoil-L-tirosina-p-nitroanilida                                                         |
| DMSO         | dimetil sulfóxido                                                                           |
| HCT          | $\alpha$ -quimotripsina de pâncreas humano                                                  |
| HPLC         | High performance liquid chromatography - CLAE<br>(cromatografia líquida de alta eficiência) |
| HT           | tripsina de pâncreas humano                                                                 |
| IEF          | focalização isoeletrica                                                                     |
| Ka           | constante de associação                                                                     |
| Ki           | constante de inibição                                                                       |
| Mpl          | marcador de ponto isoeletrico                                                               |
| MWM          | marcador de massa molecular                                                                 |
| PCT          | $\alpha$ -quimotripsina de pâncreas porcino                                                 |
| PR-Proteínas | Pathogenity Related proteins - proteínas relativas à<br>patogenicidade                      |
| PT           | tripsina de pâncreas porcino                                                                |
| SV8          | protease de <i>Staphylococcus aureus</i> linhagem V8                                        |
| TcTI-2       | inibidor de tripsina de sementes <i>Torresia cearensis</i>                                  |
| TEMED        | N-N-N'-N'- tetrametilenodiamina                                                             |
| TFA          | ácido trifluoroacético                                                                      |
| TRIS         | hidroximetil amino metano                                                                   |

## ABREVIATURAS PARA AMINOÁCIDOS

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



Exemplar adulto de *Bauhinia variegata* variedade c ndida



Exemplar adulto de *Bauhinia variegata* variedade lilás

# 1. INTRODUÇÃO

## ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

As enzimas proteolíticas ou proteases são enzimas que atacam as ligações peptídicas nas proteínas e peptídeos. As enzimas proteolíticas são classificadas em proteinases ou endopeptidases (pepsina, tripsina e quimotripsina de animais e a papaína, bromelina e ficina de vegetais) e peptidases ou hidrolases peptídicas.

As proteinases agem nas ligações peptídicas internas das proteínas, mas podem romper ligações peptídicas em peptídeos simples adequados e seus derivados (White et al., 1986).

As hidrolases peptídicas hidrolisam uma ligação peptídica associadas a um grupo amino ou carboxila terminal das cadeias polipeptídicas. Entre as mais importantes estão as carboxipeptidases, que dependem de um grupo  $\alpha$ -carboxila livre no substrato e rompem a ligação peptídica adjacente a este grupo liberando um aminoácido livre, as aminopeptidases que agem sobre uma ligação peptídica adjacente a um grupo amino livre em peptídeos simples, e as dipeptidases que agem especificamente sobre certos dipeptídeos, como por exemplo, a glicina-dipeptidase que requer  $\text{Co}^{++}$  e  $\text{Mn}^{++}$  (White et al., 1986).

Muitos processos biológicos são controlados por enzimas proteolíticas, e como exemplos marcantes deste fato destacam-se a coagulação sangüínea, a fibrinólise, a liberação de hormônios de moléculas precursoras, a reunião de estruturas macromoleculares com fibras de colágeno, a fertilização e o controle da digestão proteolítica (Neurath e Walsh, 1976). Quando as enzimas proteolíticas não são adequadamente controladas podem apresentar proteólise generalizada dos

componentes das células e tecidos, representando riscos à saúde dos organismos em questão (Neurath, 1983).

As enzimas proteolíticas, encontradas na natureza, podem ser subdivididas em quatro grupos principais, segundo a natureza de seus sítios principais e os mecanismos de ação envolvidos (Enzyme Nomenclature, 1992):

a) Cisteínoproteinases: são proteínas que contém cisteína em seu centro ativo (ex. papaína, bromelina e ficina).

b) Metaloproteinases: são proteinases que contém um íon metálico em seu centro ativo e necessitam dele como cofator para a sua ativação (ex. carboxipeptidases A e B, aminopeptidases).

c) Asparticoproteinases : são proteínas que têm o seu pH ótimo abaixo de 5.0 (ex. renina e pepsina)(Richardson, 1977).

d) Serinoproteinases : Esta classe compreende duas famílias, as serinoproteinases de mamíferos, como por exemplo, a tripsina, a quimotripsina, trombina, plasmina, elastase, calicreína, as quais se encontram também em microorganismos, plantas, animais vertebrados e invertebrados e as serinoproteinases de bactérias, cujo exemplo mais conhecido é a subtilisina, que parecia estar restrita somente às bactérias (Barret, 1986), mas pesquisas recentes mostram que se encontram proteinases homólogas à estas em células de mamíferos (Barr, 1991; Lindberg, 1991).

As serinoproteinases merecem particular destaque e são talvez as mais estudadas dentro do campo das proteases. Esse grupo, apresenta serina e histidina em seu centro ativo, que participam diretamente no mecanismo de catálise (Hartley, 1960; Richardson, 1977), envolvendo a formação de complexo covalente com o substrato. Na tripsina, os resíduos de Asp-102, His-57 e Ser-195 participam na configuração de seu centro ativo (Hartley et al., 1965). A tripsina e a quimotripsina são serinoproteinases similares quanto à origem, velocidade de síntese, modelo de ação catalítica e sequência de aminoácidos, porém apresentam diferenças de

especificidade de substrato. A tripsina hidrolisa a ligação peptídica no lado carbonil dos resíduos básicos, lisina ou arginina, e a quimotripsina hidrolisa a ligação peptídica, no lado carbonil dos resíduos aromáticos, fenilalanina, tirosina ou triptofano (Dickerson e Geis., 1969).

## **INIBIDORES DE PROTEINASES**

Inibidores de proteinases são, em termos gerais, compostos sintéticos de baixa massa molecular (Powers e Harper, 1986) ou proteínas com alta especificidade (Laskowski Jr. e Sealock, 1971) que diminuem a hidrólise enzimática de um substrato (Salvesen e Nagase, 1989). Os inibidores protéicos ou naturais com alta especificidade formam complexos estequiométricos com proteinases, inibindo competitivamente a atividade proteolítica, enquanto que alguns inibidores sintéticos podem se ligar de modo covalente ou não e reversível ou irreversivelmente ao sítio ativo.

### **Inibidores de Proteinases de Origem Vegetal**

Proteínas extraídas de plantas apresentando inibição de proteases, foram detectadas em trabalhos de pesquisadores interessados na nutrição animal, e estavam preocupados com os efeitos nocivos à dieta, exercidos por esses inibidores (Kassel, 1970; Ricahrdson, 1977; Birk, 1985). A inibição de enzimas proteolíticas por extratos de plantas, especialmente aquelas de sementes de leguminosas pode trazer conseqüências nutricionais (Liener e Kakade, 1980), e embora os inibidores sejam termolábeis, alguma atividade residual permanece nos alimentos vegetais tratados termicamente (Churella et al., 1976).

Muitas sementes de plantas da família Leguminosae contêm uma gama muito grande de substâncias que têm efeitos adversos em toda a utilização nutricional

dessas fontes de proteínas, tais como os inibidores de proteinases, hemaglutininas, anti-vitaminas, taninos, etc. Esses fatores anti-nutritivos podem interferir diretamente na digestão e absorção da dieta de proteínas por reação com as proteínas alimentares e fazê-las menos digeríveis, ou indiretamente por afetar as funções de digestão e absorção das células intestinais. Dessas substâncias, os inibidores de proteases e a hemaglutinina (lectinas) são os compostos anti-nutritivos mais importantes. Embora os efeitos dos inibidores de proteases na digestão de proteínas não sejam ainda muito claros, sabe-se que os inibidores de proteases no trato gastrointestinal reduzem a quantidade de proteólise na dieta de proteínas (Pusztai, 1986).

A descoberta de proteínas termolábeis em *Glycine max* (feijão de soja), que inibem a atividade proteolítica da tripsina, levou a conclusão que os inibidores de tripsina são responsáveis pela baixa absorção das proteínas da soja, ingeridos sem cocção. A utilização de farinha de soja crua em ratos e pintos provoca uma marcante hipertrofia do pâncreas e decréscimo na taxa de crescimento (Pearce et al., 1979; Birk, 1985). Têm sido relatados resultados contraditórios com respeito à atividade inibitória relativa de inibidores de tripsina, em relação à tripsina de diferentes origens, e diferenças consideráveis na suscetibilidade de proteases pancreáticas de diferentes espécies animais (Krogdahl e Holm, 1983).

Os estudos de Kunitz (1945,1946) iniciaram o isolamento dos inibidores de tripsina do pâncreas bovino e da soja, e demonstraram a natureza dessa proteína. Logo em seguida o primeiro estudo sistemático de inibidores de proteinase de plantas foi feito por Borchers e Ackerson (1947). Por causa da grande importância dos grãos de legumes como fonte de alimento humano e animal, as pesquisas nos anos posteriores foram concentradas principalmente nesta família.

Rascón et al.(1985) realizaram um estudo comparativo com inibidores de tripsina de feijão preto, feijão branco, feijão lima, soja, e os inibidores comerciais SBTI, LBI e EWI em enzimas pancreáticas de 12 espécies animais (coelho, rato, camundongo, hamster, cobaia, carneiro, capivara, cão, porco, cavalo e homem); e eles encontraram diferenças no comportamento dos inibidores, sendo que a tripsina de coelho mostrou-se mais sensível à todas as preparações dos inibidores, enquanto que a tripsina humana foi a mais resistente, exceto para o extrato de feijão preto. A resposta das quimotripsinas aos inibidores de plantas testados foram ainda mais variáveis, sendo que a capivara e o coelho são extremamente sensíveis. Prabhu et al. (1984) estudaram a ação dos inibidores de tripsina de 10 espécies de Leguminosae contra proteases pancreáticas bovina, porcina e humana, encontrando uma diferença considerável no comportamento dos inibidores de cada espécie com relação à atividade contra as enzimas e estabilidade térmica. As alterações, na atividade do inibidor são geralmente paralelas para a tripsina bovina e humana, portanto, testes com enzimas bovinas podem ser usados para estimar o efeito do processo de inibição de enzimas humanas. (Weder et al., 1992).

O reconhecimento do envolvimento da proteólise na regulação do metabolismo protéico intracelular e no processo de proteínas e peptídeos precursores, tais como em processos associados com a coagulação do sangue e a regulação hormonal, aumentou o interesse nas bases bioquímicas, fisiológicas e aplicações médicas da ocorrência natural de inibidores de proteólises. A possibilidade de aplicação terapêutica dos inibidores da trombina, plasmina e calicreína no controle de processos fisiopatológicos, tais como, a coagulação do sangue e fibrinólise, relacionados com o sistema cininogênio-cinina em mamíferos, tem levado a numerosos estudos desses inibidores em plantas. Alguns pesquisadores mostraram que as Solanaceae (batata) e as Leguminosae (feijão, bauínea ou unha de vaca, soja, leucena, cowpea, etc.) são fontes ricas de proteínas que são fortemente inibidoras das calicreínas do plasma humano (Hojima et al., 1971 ab; Hojima et al.,

1973 ab; Hojima et al., 1980; Sampaio et al., 1990), proteínas estas que participam da cascata de coagulação sangüínea.

Os inibidores vegetais têm sido amplamente estudados em Leguminosae, Gramineae e Solanaceae, em grande parte pelo fato dessas famílias apresentarem numerosas espécies, utilizadas como alimentos (Richardson, 1977). A família Leguminosae (ou Fabaceae) compreende 3 sub-famílias: Mimosoideae, Caesalpineoideae e Papilionoideae. Dentre as sub-famílias a Mimosoideae é considerada mais primitiva, e a presença de inibidores em *Albizzia julibrissin* (Odani et al., 1979) pode indicar um passo evolucionário importante (Kortte e Jermyn, 1981).

Sampaio et al (1990), avaliaram cerca de 50 espécies de Leguminosae, das quais foram isolados inicialmente inibidores de quatro delas: *Enterolobium contortiliquum* L., *Torresia cearensis* L., *Bauhinia petandra* L., *Bauhinia bauhinoides* L. (Oliva et al., 1987; Oliva et al., 1988a; Oliva et al., 1988b; Tanaka et al., 1989;), e os testes, com respeito à habilidade em afetar a coagulação sangüínea, mostraram que a fase da protrombina é alterada substancialmente na presença dos inibidores de *E. contortiliquum* , *T. cearensis* e *B. bauhinoides* através do acréscimo no tempo parcial na atividade da tromboplastina (Sampaio et al., 1992) .

A determinação da estrutura primária completa dos inibidores de tripsina TCTI-2 (*Torresia cearensis*), tipo Bowman-Birk, inibidores de serino proteinase, permitiu localizar seus dois centros ativos, que contém Lys e Ser (posições 15-16) e His-Ser (41-42) (Tanaka, 1993).

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

## **Família dos inibidores**

Os inibidores de serino proteinases estão distribuídos em 8 principais famílias :

**A) Inibidor tipo abóbora** : tem aproximadamente 30 resíduos de aminoácidos, massa molecular na ordem de 4000 e apenas 3 pontes de dissulfeto, e inibem principalmente tripsina e fator Xlla (Hara et al., 1989). Apesar dos inibidores de abóbora serem relativamente pequenos, são muito potentes com uma constante de associação ( $K_a$ ) de  $5.9 \times 10^{10}$  a  $9.5 \times 10^{11}$ , estando entre as maiores constantes de inibidores de tripsina já estudados (Wieczorek et al., 1985).

**B) Superfamília Cereal**: Nesta família encontram-se os inibidores bifuncionais de  $\alpha$ -amilase e proteinases, e as proteínas que apresentam alta homologia com estas, mas não têm atividade inibitória (Richardson, 1991). Pertencem à esta família os inibidores de tripsina de cevada (Odani et al., 1983), milho (Mohoney et. al., 1984) e centeio (Lyons et. al., 1987).

**C) Família Ragi 1-2** : é a família de inibidores homólogos ao inibidor de  $\alpha$ -amilase isolado de sementes de *Eleusini* (RAGII-2), os quais são bifuncionais inibindo  $\alpha$ -amilase/ proteinase (PAPI). (Richardson, 1991). Pertencem à esta família o inibidor de cevada, uma proteína de arroz sem atividade inibitória conhecida (Yu et al., 1988) com 76% de homologia com RAGII-2.

**D) Família taumatina e PR-proteínas**: são proteínas induzidas relacionadas à defesa da planta, as quais têm homologia com a taumatina, uma proteína doce extraída de frutos de *Thaumatococcus danielli* (Edens et al., 1982). Essa classe de proteínas têm a função inibitória desconhecida, mas pela alta homologia do inibidor

bifuncional de milho (Blanco-Labra e Iturbe-Chinas, 1981), sugere que eles possam ser inibidores de enzimas proteolíticas (Richardson, 1991).

**E) Inibidores tipo Batata I e Batata II :** a família dos inibidores tipo batata I inclui todos aquelas seqüências as quais mostraram alta homologia com o inibidor quimotríptico, isolados de tubérculos de batatas. Eles apresentam massa molecular em torno de 8500, de 73 a 77 resíduos de aminoácidos, baixo conteúdo de cisteína (apenas uma ponte de dissulfeto) (Richardson, 1991). Esses inibidores são encontrados também na sanguessuga (*Hirudo medicinalis*), e é uma das famílias de inibidores mais difundidos dos já conhecidos, presentes também em Solanaceae, Gramineae, Leguminosae, Polygonaceae, Cucurbitaceae e nos animais (Nasawa et al., 1989; Richardson, 1991).

O inibidor tipo batata II apresenta massa molecular de 12000 e 96 à 98 resíduos de aminoácidos, alto conteúdo de cisteína (aproximadamente 6 pontes de dissulfeto). O primeiro inibidor tipo batata II, que foi completamente sequenciado, foi o inibidor de tripsina do pericarpo da *Solanum melongeni* (Richardson, 1979). O seu sítio reativo foi identificado na ligação Arg (38)-Asp(39). A mesma ligação peptídica foi também encontrada na localização homóloga no inibidor de tripsina de batata PTI-1. O inibidor tipo batata II tem um grau de homologia muito limitado com as regiões dos N-terminais dos inibidores de carboxipeptidases da batata e do tomate (Richardson, 1991). Os inibidores tipo batata I e II inibem principalmente a quimotripsina, tripsina e subtilisina, sendo o inibidor tipo batata II melhor inibidor para a subtilisina (Plunkett e Ryan, 1980; Plunkett et al., 1982).

**F) Inibidor tipo Kunitz :** a família dos inibidores tipo Kunitz é composta por um grande número de inibidores já descritos. O primeiro inibidor tipo Kunitz, que teve a estrutura primária estudada, foi o inibidor de proteinase da soja (*Glycine max* L.) (Koide e Ikenaka, 1973 ab). Os inibidores tipo Kunitz apresentam uma cadeia simples com massa molecular em torno de 20000 (aproximadamente 180 resíduos

de aminoácidos e um resíduo de ácido aspártico na extremidade N-terminal) e incluem quatro cisteínas com duas pontes de dissulfetos. Além do inibidor do SBTI (inibidor de tripsina da soja), foram caracterizados os inibidores isolados de *Psophocarpus tetragonolobus* (Shibata et al., 1986), *Erythrina latissima* (Joubert et al., 1985), *Adenanthera pavonina* (Richardson et al., 1986), *Bauhinia petandria* e *Bauhinia bauhinoides* (Oliva et al., 1988 b). Sabe-se que os inibidores tipo Kunitz são encontrados não somente em Leguminosae, mas foi caracterizado a estrutura primária do inibidor de catepsina D do tubérculo de batata com uma grande relação com os inibidores tipo Kunitz das Leguminosae (Mares et al., 1989), e certos inibidores bifuncionais de  $\alpha$ -amilase 1, proteinase isolada da cevada, trigo e arroz, que exibem um grau de homologia (20-30%) com os inibidores das Leguminosae (Yoshikawa et al., 1976; Odoni et al., 1979; Mundy et al., 1984). O inibidor tipo Kunitz possui um sítio reativo inibitório em posições homólogas nas ligações Arg(63)-His(64) (Koide et al., 1973 c).

**G) Inibidor tipo Bowman-Birk :** os primeiros inibidores de enzimas, isolados de sementes vegetais, foram os do tipo Bowman-Birk cuja cadeia de aminoácidos foi completamente sequenciada para a proteína isolada do feijão lima (*Phaseolus lunatus* L.) e da soja (*Glycine max* L.). Este tipo de inibidor está presente em grande quantidade nas sementes de Leguminosae e foi sequenciado em outras sementes como do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), do feijão azuki (*Vigna angularis* L.), feijão mung (*Vigna radiata* L.) e outros, apresentando uma forte homologia. (Richardson, 1991). Esse tipo de inibidor apresenta como características, massa molecular em torno de 10000, 71 resíduos de aminoácidos, dos quais 14 são resíduos de cisteína que formam 7 pontes de dissulfeto intramoleculares, com uma tendência de se auto-associarem. O inibidor tipo Bowman-Birk (BBI) possui dois sítios de inibição independentes, um Lys(16)-Ser(17), que inibe a tripsina, e o outro Leu(43)-Ser(44), que inibe a quimotripsina, podendo formar um complexo ternário com tripsina e quimotripsina (Birk, 1985).

Múltiplas formas das duas classes de inibidor, Kunitz e Bowman-Birk foram encontrados na soja (Birk et al. 1963; Odani e Ikenaka, 1977; Hwang et al., 1977; Orf e Hymowitz, 1979; Stahlhut e Hymowitz, 1983; Tan-Wilson et al., 1985).

### **Papel dos inibidores nas sementes**

Atribuem-se aos inibidores de origem vegetal vários papéis como:

1. Proteínas de Reserva: a presença de inibidores em vários tecidos pode ser correlacionada com diferentes estágios fisiológicos de desenvolvimento. Por exemplo, o aparecimento de formas modificadas de inibidores do tipo Bowman-Birk em *Vigna radiata* indica a degradação do inibidor, por proteólise, durante a germinação e o crescimento, o que indicaria que os inibidores estariam sendo utilizados como proteínas de reserva (Wilson e Chen, 1983). Shain et al. (1968) e Kirsi e Mikola (1971) demonstraram que a presença de inibidores de tripsina na cevada e alface, respectivamente, diminuírem em concentração nos cotilédones e aumentam nos brotos durante a germinação. Na soja os inibidores estão concentrados nos cotilédones. Na cevada, trigo, centeio, aveia e milho, estão concentrados no endosperma e em cevada, trigo, centeio e aveia eles também estão presentes no embrião. Na batata são encontrados no córtex dos tubérculos (Ryan, 1973). Por conter alta concentração de cisteína e cistina, vários autores apontam o seu valor como reserva de enxofre para a plântula (Hartl et al., 1986). Outra indicação é que a biossíntese do inibidor durante o desenvolvimento da semente coincide com a biossíntese das proteínas de reserva (Robertson e Hill, 1989).

2. Reguladores de Proteínas Endógenas: o inibidor de proteinase em sementes de alface aparentemente inibiu a atividade de uma enzima proteolítica endógena da semente (Shain et al., 1965). Como a atividade enzimática aumentou durante a

germinação, o inibidor desapareceu. Isso sugeriu que a enzima estava presente numa forma inativa, num complexo com o inibidor, ou a enzima foi ativada a partir de um precursor, que bloqueou o inibidor a medida que a sua atividade foi aumentada (Ryan, 1973). O inibidor de tripsina de trigo foi ativo contra a protease endógena da própria semente, sugerindo um papel regulatório para este inibidor, o qual deve controlar o metabolismo durante o desenvolvimento da germinação da semente por formar complexos inativos tripsina-inibidor (Poerio et al., 1989).

3. Proteção de Plantas: Lipke et al. (1954) iniciaram os estudos dos inibidores sobre a dieta de insetos. Seguidos pelos estudos de Birk e Applebaum (1960), encontraram a inibição do crescimento de larvas de *Triboleum*. Devido à isso os inibidores de serinoproteinases têm sido estudados em detalhe com respeito à função de defesa das plantas. Em detrimento do efeito desses inibidores em larvas de insetos, nota-se que há uma relação entre os inibidores e a defesa das plantas, mostrando uma abundância de serino proteinases no trato digestivo e/ou secreções de herbívoros, patógenos e pragas (Bowles, 1990).

O acúmulo de inibidores dos tipos batata I e II em tomates (Plunkett et al., 1982; Bishop et al., 1984), alfafa (Brown et al., 1985), lesados por ataques de insetos ou outros fenômenos físicos, é considerado como resposta de defesa. Esse acúmulo deve-se a um hormônio chamado de fator indutor de inibidor de proteinase (PIIF) que é liberado no local do ferimento (Plunkett et al., 1982). Green e Ryan (1972) estudando as folhas de batatas lesadas pelo besouro da batata do Colorado e suas larvas notaram rápido acúmulo de inibidor de proteinase nos tecidos da parte aérea das plantas. Este efeito pode ser estimulado pela injúria mecânica nas folhas. Bishop et al. (1984) isolaram o PIIF de folhas de plantas jovens de tomate.

Godbole et al. (1994) sugeriram que os inibidores de feijão guandu *Cajanus cajan* têm papel de defesa na semente, não encontrando evidências para outras

funções. Sallai (1993), em uma avaliação preliminar da ação dos inibidores de tripsina em sementes de *Bauhinia* sobre extratos digestivos de insetos, observou a inibição das enzimas proteolíticas tipo tripsina, revelando uma possível ação dessas proteínas na proteção das sementes.

## MECANISMO DE REAÇÃO DO COMPLEXO ENZIMA/INIBIDOR

Os mecanismos de inibição dos inibidores de proteinases é competitivo, formando um complexo enzima inibidor inativo, sendo que as enzimas reconhecem o sítio reativo do inibidor.

Os inibidores de serinoproteinases reagem num complexo estequiométrico 1:1. A equação do mecanismo clássico, sugerida por Laskowski e Kato (1980)



onde, L e L\* são complexos não covalentes, rapidamente dissociáveis, I\* é o inibidor modificado, C é o complexo estável E-I, e X é o intermediário antes da etapa de modificação química. A enzima reage com a molécula do inibidor como se ele fosse um substrato, entretanto, as partes permanecem ligadas num forte complexo covalente através do resíduo de aminoácido da região N-terminal do sítio reativo do inibidor, não havendo uma dissociação da molécula clivada pela enzima. A enzima reconhece como substrato potencial aquele resíduo do centro ativo, porisso existem inibidores de tripsina tipo arginina ou lisina, e inibidores de quimotripsina do tipo fenilalanina ou metionina (Laskowski e Kato, 1980).

Esta equação se refere à inibidores com o mecanismo clássico, isto é, inibição reversível, em que a concentração da enzima é muito pequena em relação à concentração do inibidor e do substrato, e o equilíbrio entre a enzima e o inibidor é rapidamente alcançado. Entretanto há certos inibidores que não se encaixam nestas condições, chamados segundo o mecanismo de reação de "tight-binding", isto é, as concentrações do inibidor são comparáveis às da enzima, e o equilíbrio é rapidamente alcançado (Morrison, 1982).

## **COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA**

A formação do coágulo é um modelo de proteólise e consiste de uma sequência de ativação de zimogênios, envolvendo interações proteína-proteína, resultando em reações, que levam à formação de trombina (Jackson e Nemerson, 1980). A fase intrínseca da coagulação é também chamada plasmática porque nela interferem fatores coagulantes e anticoagulantes, que circulam no plasma. O fator ativado ( $X_a$ ) é formado pelos fatores plasmáticos, sem a necessidade do fator tecidual, e esta via da formação da tromboplastina é chamada intrínseca ou endógena (Almeida, 1989). Entre os inibidores de serinoproteinases, que podem regular os fatores da coagulação estão inibidor inter- $\alpha$ -tripsina,  $\alpha$ -2-macroglobulina,  $\alpha$ -1-anti-quimotripsina etc. (Travis e Salvesen, 1983).

A formação da tromboplastina pode se fazer uma segunda via distinta chamada extrínseca ou exógena se faz as custas de um fator tecidual, encontrado em todos os tecidos e principalmente nos pulmões, cérebro e placenta, e é liberado pela lesão dos tecidos, e os componentes ativos são lipoproteínas. O fator tecidual interage com os fatores VII e X juntamente com o cálcio, formando um fator X ativado, o qual juntamente com o fator V, cálcio e fosfolipídeos forma o ativador extrínseco da protrombina. Pela ativação da protrombina forma-se a trombina, que, por sua vez, transforma o fibrinogênio em fibrina.

## **CALICREÍNAS**

As calicreínas representam um grupo de serino proteases encontradas em células glandulares, neutrófilos e fluídos biológicos. Tais enzimas estão divididas em dois grupos: tissular e plasmática (Fiedler, 1979), que diferem entre si quanto ao massa molecular, ponto isoelétrico, especificidade por substrato, tipo de cinina liberada e importância funcional (Fritz et al., 1977; Bhoola et al., 1992).

As calicreínas tissulares estão envolvidas em várias funções, dependendo da célula e tecido em contexto. Contudo, o principal efeito das calicreínas tissulares consiste na liberação de cininas, peptídeos ativos responsáveis por eventos inflamatórios, hipotensão, aumento de permeabilidade vascular (edema), entre outros.

## **APLICAÇÃO DOS INIBIDORES**

Há um interesse muito grande no possível uso de inibidores de proteinase de plantas no tratamento de uma gama muito grande de distúrbios metabólicos associados à enzimas proteolíticas, por exemplo, pancreatites, enfizemas, alergias, inflamação, hipertensão e certos câncers (Richardson, 1991). Alguns estudos epidemiológicos verificaram que a ocorrência de câncer em humanos está ligada à dieta, sendo menor em populações que se alimentam de produtos com alta concentração de inibidores tipo Bowman-Birk (Correa, 1981). A atividade anticarcinogênica dos inibidores tipo Bowman-Birk e outros inibidores sugere o envolvimento de enzimas na indução ou na expressão de transformações de

fenótipos, ou no processamento de proteínas celulares específicas envolvidas na transformação cancerígena (Fagan e Waxman, 1991).

Os inibidores de tripsina tipo Kunitz e Tipo Bowman-Birk da soja e inibidores de papaína, reduziram a frequência de mudanças cromossômicas de células de pacientes com síndrome de floração (Kennedy et al., 1984). O inibidor de  $\alpha$ -amilase de trigo é usado em exames laboratoriais para diagnosticar hiperamilasemia.

## O GÊNERO *Bauhinia*

As *Bauhínias* são árvores ou arbustos pertencentes à família Leguminosae, sub-família *Caesalpinoideae* (Hutchinson, 1964). Encontra-se por volta de 570 espécies de *Bauhinia* (Heywood, 1971), em toda a zona equatorial, tropical e subtropical do planeta. No Brasil elas habitam toda a área Meridional (Pio-Correa, 1978), é muito comum nas matas capoeiras e terrenos cultivados, sendo tida como padrão de terra boa (Kuhlman e Kuhn, 1947). Foi também encontrada por Martins (1979), Pagano et al. (1987) e Cesar (1988) em matas mesófilas semidecíduas de planalto, no Estado de São Paulo.

A espécie é popularmente conhecida por suas propriedades medicinais no tratamento de infecções urinárias, diabetes (Pio-Correa, 1978), elefantíase e moléstias da pele (Cruz, 1982).

As sementes das *Bauhínias* mostram diversas características que as distinguem das demais sementes de *Caesalpinoideae*; tais como: forma assimétrica, com a rafe mais longa que a anti-rafe (semente obcampilótropa); feixe rafeal sem extensão pós calazal; ausência da camada de osteoclerídeos na hipoderme ou na epiderme interna da testa (Corner, 1976). A *Bauhinia variegata*, assim como a *B. forficata* e *B. fassoglesis*, mostram uma característica importante, a presença da

linha lúcida mediana bem evidente em toda a extensão exotesta, diferenciando-a das outras espécies (Beltrati e Paoli, 1989).

Alguns estudos foram feitos com relação à inibidores de proteases de sementes de *Bauhínias*. Goldstein et al. (1973) isolaram um inibidor de protease de sementes de *Bauhínia*, o qual, inibiu diversas serinoproteinases e cisteínoproteinases. Pinsky e Shwimmer (1974) purificaram parcialmente um inibidor de tripsina e quimotripsina de *Bauhinia purpurea*. Jansen et al. (1986) relataram a presença de inibidores de enzimas proteolíticas em sementes de *Bauhínia glabra*, *Bauhínia pauletia* e *Bauhinia unguolata*. Oliva (1988) purificou o inibidor de tripsina de *Bauhinia bauhinoides* e *Bauhinia pentandra*, e Sallai (1993) isolou e caracterizou os inibidores de proteinases de *Bauhinia forficata* Link, *Bauhinia rufa* Bongard e *Bauhinia unguolata* Linneu.

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo:

Purificação e caracterização físico-química dos inibidores de tripsina de sementes de *Bauhinia variegata* variedade cândida e *Bauhinia variegata* variedade lilás.

Estudar o comportamento dos inibidores das duas variedades contra enzimas de diferentes animais.

Estudar o efeito dos inibidores em edema de pata de coelhos.

Determinar a estrutura primária da porção amino-terminal dos inibidores de tripsina das sementes das duas variedades e determinar a estrutura primária completa de um inibidor de tripsina de sementes de *Bauhinia variegata* variedade cândida

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL VEGETAL

Sementes maduras de *Bauhinia variegata* de ambas as variedades cândida e lilás foram obtidas do Instituto Florestal do Estado de São Paulo, São Paulo, Brasil.

#### 3.2. REAGENTES, ENZIMAS E SUBSTRATOS

Tripsina de pâncreas bovino ( BT) 3,5 U/mg (MERCK); tripsina de pâncreas bovino - sequencing grade Lyophilized powder T-8658 Lot 25H8255 (SIGMA);  $\alpha$ -quimotripsina de pâncreas bovino (BCT) 87U/mg (SERVA); tripsina de pâncreas de porco (PT) cristalizado e liofilizado (SERVA); quimotripsina de pâncreas de porco (PCT) foi utilizado tripsina tipo II extrato bruto de pâncreas de porco, 1,540 ATEE U/mg de quimotripsina (SIGMA) ; extrato bruto do suco duodenal humano ( HT e HCT) foi obtido em hospital local; calicreína de plasma humano e Fator Xa foram obtidos no Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina; substrato tosil-GLY-PRO-ARG-NAN (Chromozym Th) (Boehringer); substrato HD-PRO-PHE-ARG-NAN (S-2238) (Kabi diagnostica); substrato N-benzoil-L-arginina-p-nitroanilida ( BAPNA) (MERCK); substrato N-benzoil-L-tirosina-p-nitroanilida (BTPNA) (SIGMA).

Marcador de ponto isoelétrico (SERVA); marcador de massa molecular - SDS Molecular Weight Markers (Sigma); reagentes para sequenciamento grau de sequência (Applied Biosystems);

### **3.3. MÉTODOS**

#### **ISOLAMENTO DOS INIBIDORES**

---

Foram utilizadas duas metodologias para a extração do inibidor. Uma para a determinação das constantes de inibição contra serinoproteases e purificação e uma segunda para a determinação da atividade do inibidor sobre tripsina e quimotripsina bovina, humana e porcina , segundo Weder (1978).

#### **Monitoramento da atividade inibitória sobre tripsina**

A dosagem da atividade inibitória sobre tripsina foi feita através da medida fotométrica em 405 nm da p-nitroanilida liberada após hidrólise enzimática com substratos cromogênicos, segundo Erlanger et al (1961) em cada etapa do isolamento e purificação.

O substrato cromogênico derivado da p-nitroanilida, o BAPNA foi utilizado no ensaio, onde a tripsina (10ug) foi pré-incubada durante 10 minutos, a 37°C, com uma concentração única da amostra em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0. Após o tempo descrito, foi adicionado o substrato em excesso, e a incubação seguiu a 37°C até a obtenção de cor (amarela, devido ao produto da hidrólise p-nitroanilida). A reação foi interrompida por ácido acético 30% (v/v) e a hidrólise do substrato pela enzima foi acompanhada fotometricamente em 405 nm. As frações ativas foram utilizadas nas etapas seguintes de purificação e as frações sem atividade foram descartadas.

### **Preparo do extrato salino**

As sementes inteiras foram trituradas em um triturador de grãos doméstico até a obtenção de um material finamente pulverizado. As sementes trituradas foram homogeneizadas em liquidificador doméstico com solução salina (1:10 v/v), e a suspensão foi mantida sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente para a extração das proteínas. A suspensão obtida foi filtrada em gaze e centrifugada em centrífuga refrigerada a 1500 x g, por 20 minutos a 4°C, sendo o precipitado descartado e o sobrenadante foi o material utilizado nos passos posteriores. Esta metodologia de extração foi utilizada para os ensaios de determinação dos  $K_i$  dos inibidores de tripsina das sementes de *Bauhinia* contra tripsina bovina,  $\alpha$ -quimotripsina, calicreína plasmática e fator Xa, bem como para a purificação.

### **Fracionamento cetônico 80%**

O extrato salino obtido foi fracionado pela adição lenta de acetona sob agitação, a 4°C. O precipitado formado foi secado à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado.

### **PURIFICAÇÃO DOS INIBIDORES**

A purificação dos inibidores de tripsina de *Bauhinia variegata* variedade cãndida e variedade lilás se deu por um "Batch" em resina de troca iônica DEAE-Sephadex A 50, uma cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G 75, uma cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE- Sephadex A 50, , uma cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superose 12 e uma cromatografia de fase reversa em HPLC.

### **"Batch" em resina de DEAE-Sephadex A50**

A resina foi preparada anteriormente conforme instruções do fabricante. 100 ml de resina inchada foi equilibrada com o tampão inicial Tris-HCl 0,05M pH 8,0.

O material resultante da precipitação cetônica foi ressuspenso em água, clarificado por centrifugação a 3000 x g por 15 minutos, e, diluído em água deionizada até a condutividade elétrica da solução ficar menor do que a do tampão inicial.

A eluição foi realizada com o Tris-HCl 0,05M pH 8,0, Tris-HCl 0,05M/0,3M NaCl, Tris-HCl 0,05M/0,5M NaCl e Tris-HCl 0,05M/0,8M NaCl, respectivamente.

Todo o material eluído nas diversas colunas estudadas era monitorado com relação ao teor protéico e à atividade. A proteína foi determinada espectrofotometricamente em 280 nm. As frações com atividade biológica eram reunidas e liofilizadas antes de serem submetidas à coluna seguinte.

### **Cromatografia de Exclusão Molecular em coluna de Sephadex G-75**

O material anterior foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 0,05M/ 0,15M NaCl e cromatografado em uma coluna de vidro ( 104 x 2,2 cm) equilibrada com o mesmo tampão de diluição da amostra, com um fluxo constante de 12 ml por hora.

### **Cromatografia de Troca iônica em coluna de DEAE-Sephadex A50**

O material anterior foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0 e cromatografado à temperatura ambiente em coluna de DEAE-Sephadex A50, a um fluxo constante de 1,0 ml por minuto. A eluição foi feita com tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0 com gradiente de 0,01-0,5M NaCl.

## **Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superose 12**

O material anterior foi ressuspensionado em água e recromatografado em coluna de Superose 12 (Pharmacia) Hr 10/30, acoplado ao FPLC (Pharmacia), e, eluído com tampão Tris-HCl 0,05 M, a um fluxo de 0,5 ml /minuto.

## **Cromatografia de Fase Reversa em HPLC**

O material liofilizado após a cromatografia de exclusão molecular em Superose 12 foi ressuspensionado em 200 µl de uma solução de TFA 0,1% em água (solvente A) e submetido a uma cromatografia em fase reversa em coluna Boundapak C18 acoplada ao HPLC (Waters).

A coluna foi equilibrada em solução de TFA 0,1% em água obtida por sistema MILLI Q (solvente A). O material aplicado à coluna foi eluído com TFA 0,1% em acetonitrila (solvente B) com gradiente linear de 0 à 100 de tampão B em 60 minutos de corrida. O material purificado recolhido foi liofilizado e guardado à temperatura de - 18°C.

## **ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE-SDS)**

O método utilizado foi essencialmente aquele de Shapiro, (1967) e Weber (1969).

### Preparação do Gel

O gel de corrida ( 12,5%) foi preparado a partir de uma solução estoque 0,4M de acrilamida e 4 mM de bis acrilamida que foram preparados com tampão Tris-HCl 3M pH 8,45 sem SDS. Em cada gel foi acrescentado 0,025 ml (v/v) de N,N,N'',N''-

tetrametiletilenediamina (Temed) e 0,075 ml de uma solução de persulfato de amônio (10%).

#### Preparação da Amostra

As amostras (10 a 50  $\mu$ l de uma solução de aproximadamente 1 mg de proteína por ml) foram dissolvidas em tampão TRIS HCl 0,08M pH 6,8, contendo 10 % de glicerol e 0,001 % de azul de bromofenol. Essas amostras foram analisadas na sua forma nativa.

#### Coloração

O gel foi corado em coomassie blue 0,2% a 37°C, e o excesso de corante removido em ácido acético 7%.

### **DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE INIBIÇÃO ( $K_i$ )**

#### Hidrólise de substratos cromogênicos

A atividade inibitória dos inibidores de proteinases presentes nas sementes das *Bauhínias* foi determinada através da hidrólise de substratos cromogênicos, substratos sintéticos derivados da p-nitroanilida. Os ensaios foram realizados em excesso de substrato e o produto de hidrólise ( p-nitroanilida) foi acompanhado por verificação da absorbância em 405 nm.

## Dosagem do inibidor contra tripsina

### Determinação da concentração de tripsina ativa

A concentração de tripsina ativa usada nos ensaios foi determinada pela titulação fotométrica do sítio ativo por p-nitrofenil-p'-guanidinobenzoato (NPGB), de acordo com Chase e Shaw (1970) e Sampaio e cols. (1984). O ensaio foi feito em espectrofotômetro Beckman modelo 25, empregando-se 900 µl de tampão barbitol 0,06M pH 8,3, aos quais foram adicionados 100 µl de solução de tripsina 1,0 mg/ml (em peso) seguidos de 5 µl do substrato (NPGB) 9,4 mM. O título da tripsina ativa foi acompanhado através da hidrólise do substrato, estimada pela leitura em 410 nm do p-nitrofenol liberado.

Para o cálculo da concentração da tripsina ativa, utilizou-se a leitura obtida multiplicada por  $6,025 \times 10^{-5}$ , que é o resultado da relação entre o coeficiente de extinção molar do p-nitrofenol formado nas condições do ensaio, e a diluição dos reagentes.

### Medida da inibição sobre tripsina

Este ensaio foi feito para cada etapa da purificação com o objetivo de acompanhar a curva durante o processo. Nestes ensaios o substrato cromogênico utilizado foi o BAPNA 1 mM. Para a dosagem, tripsina (10 µg) foi pré-incubada durante 10 minutos, a 37°C, com diferentes concentrações do inibidor em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, sendo de 1,0 mL o volume da pré-incubação. Decorrido o tempo descrito, 1,0 mL de substrato foi adicionado e a incubação prosseguiu a 37°C por mais 10 minutos. A reação foi interrompida por acidificação pela adição de 500 µL de ácido acético 30% (v/v) e a hidrólise do substrato pela enzima foi acompanhada fotometricamente em 405 nm. O cálculo

da atividade inibitória foi feito pela determinação da atividade residual da tripsina no ensaio.

#### **Medida da inibição sobre enzimas da coagulação (HuPK, fator Xa).**

No ensaio de inibição de calicreína plasmática humana (HuPK) utilizou-se o Ac-Phe-Arg-p-Nan 1,0 mM como substrato, e para o ensaio com o fator Xa foi utilizado S-2302 8,6 mM como substrato. As enzimas foram previamente incubadas com diferentes concentrações do inibidor por 15 minutos, a 37°C. Para dosar o fator Xa o tampão utilizado foi Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,1 M, EDTA 0,15 M, pH 8,3. Após a pré-incubação o substrato foi adicionado, e decorrido o tempo de hidrólise, as reações foram interrompidas por acidificação pela adição de 500 µL de ácido acético 30%. O cálculo da atividade inibitória foi efetuado pela atividade residual das enzimas comparando-se os resultados obtidos através da absorbância verificada em 405 nm na presença e na ausência do inibidor.

#### **Cálculo das constantes de inibição ( $K_i$ )**

As constantes de inibição foram determinadas através da constante de dissociação do complexo enzima-inibidor ( $K_i$ ). As determinações foram feitas seguindo-se o modelo proposto por Morrison (Knight, 1986), adaptado a um programa de cinética enzimática em computador, sendo o valor numérico calculado pelo programa ENZFITTER.

## **DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DOS INIBIDORES DE TRIPSINA E $\alpha$ -QUIMOTRIPSINA BOVINA, PORCINA E HUMANA**

Preparo do extrato do inibidor de tripsina a partir de sementes de *Bauhinia variegata* variedade cândida e variedade lilás.

A extração dos inibidores de tripsina de sementes de *B. variegata* var. cândida e variedade lilás foi feita, como descrito por Weder (1978). Os inibidores foram extraídos em baixo pH com ácido sulfúrico. 5 g de sementes trituradas foram colocadas em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,25N, e deixadas sob agitação durante 1 hora. A solução foi centrifugada a 1500 x g durante 20 minutos. 70 mL do sobrenadante foram ajustados para o pH 7,6 com NaOH. Completou-se o volume para 100 mL com tampão Tris-HCl 0,2M pH 7,6, 66 mM  $\text{CaCl}_2$ .

Determinação da atividade de tripsina bovina e porcina

Foi feita uma curva de calibração das enzimas pré-tituladas. Uma solução de 0,1 mg/mL de tripsina dissolvida em 1 mM de ácido clorídrico foi pipetada em tubos de ensaio em quantidades crescentes de 0,05 a 0,25 mL em duplicata, e acrescentado tampão Tris-HCl 0,2M pH 7,6, contendo 66 mM  $\text{CaCl}_2$  até o volume final de 2,90 mL. Após incubação por 10 minutos a 30°C, foi acrescentado em intervalos regulares cronometrados, 0,1 mL de uma solução de BAPNA de 5 mg/mL em dimetilformamida. Incubou-se por 10 minutos a 30°C e interrompeu-se a reação com ácido acético 30%, no mesmo intervalo e ordem em que se acrescentou o BAPNA; foi lida a absorbância a 405 nm. As enzimas utilizadas nesse experimento foram tituladas como descrito anteriormente.

### Determinação da atividade da quimotripsina bovina e porcina

A curva de calibração da quimotripsina foi feita com a enzima titulada com sulfona do ácido 2-hidroxi-5-nitro-benzeno, segundo Klockow (1972). Uma solução de 0,2 mg/mL de quimotripsina dissolvida em 1 mM de ácido clorídrico foi pipetada em tubos de ensaio em quantidades crescentes de 0,05 a 0,30 mL em duplicata, e acrescentado tampão Tris-HCl 0,2M pH 7,6, contendo 66 mM  $\text{CaCl}_2$  até o volume final de 2,90 mL. Após incubação por 5 minutos a 30°C, foi acrescentado em intervalos regulares cronometrados 0,3 mL de uma solução de BTPNA de 0,81 mg/mL em dimetilformamida. Incubou-se por 15 minutos a 30°C e interrompeu-se a reação com ácido acético 30%, no mesmo intervalo e ordem em que se acrescentou o BTPNA. A absorbância foi lida a 405 nm.

### Determinação da atividade do inibidor de tripsina

A determinação da quantidade do inibidor nos extratos foi feita pela inibição da tripsina, medida sobre o BAPNA. Pipetou-se de 0,2 a 0,8 mL da amostra de inibidor em solução. Adicionou-se 0,2 mL da solução de tripsina e completou-se o volume para 2,9 mL com tampão Tris-HCl 0,2M pH 7,6 contendo 66 mM  $\text{CaCl}_2$  e procedeu-se como descrito anteriormente.

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

### Determinação da atividade do inibidor de quimotripsina

O método seguiu o seguinte esquema : pipetou-se de 0,2 a 0,8 mL da amostra de inibidor em solução ; adicionou-se 0,2 mL da solução de quimotripsina e completou-se o volume para 2,7 mL com tampão Tris-HCl 0,2M , pH 7,6 , 66 mM  $\text{CaCl}_2$  ; para os tubos de referência misturou-se 0,2 mL da solução de quimotripsina com 2,5 mL de tampão em duplicata. A seguir procedeu-se como descrito anteriormente.

### Preparo do extrato do suco duodenal bruto humano

O suco duodenal bruto foi obtido em hospital local através da coleta de rotina. O suco é conservado até o seu uso à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Após o descongelamento da amostra a ser utilizada, esta é filtrada em filtro de papel 589<sup>3</sup> banda azul (Schleicher e Schuell) Ref. nº 300208. Após a clarificação o extrato deve ser usado no mesmo dia.

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

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

O suco duodenal bruto clarificado é diluído em HCl 0,005M de modo que 0,2 mL dê a mesma leitura em absorbância  $A_{405}$  obtida para a tripsina ou  $\alpha$  quimotripsina bovina quando se fez a curva de calibração destas de acordo com a enzima que se quer determinar a atividade. Estes resultados dão uma curva linear, podendo-se comparar com as enzimas bovinas.

## FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA

Foi estabelecido um método para a determinação direta da atividade inibitória sobre tripsina de sementes de *Bauhinia variegata* variedade cãndida e variedade lilás após a focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida que permite analisar a atividade inibitória de tripsina em preparações desde a extração da farinha de semente até a fase final de purificação, diretamente sobre as placas de eletroforese em gel de poliacrilamida nativo com um gradiente de pH (focalização isoelétrica).

O gel é incubado com tripsina e revelado com o substrato específico, sendo a presença do inibidor revelado pela reação negativa na região do gel onde ele se encontra.

Para o estabelecimento do método foi necessário repetir várias vezes o procedimento, procurando otimizar as quantidades de material aplicado, melhor localização de aplicação no gel e, paralelamente a isso, o gradiente de pH em que se focalizam os inibidores.

Foi utilizado o gel de poliacrilamida comercial GEL CLEAN IEF (Pharmacia), com 0,43 mm de espessura, e concentração 5% de acrilamida.

### Determinação da faixa de pH

O gel seco foi reidratado segundo orientação do fabricante (Pharmacia) durante 90 minutos. A reidratação do gel consistiu em uma solução com sorbitol (10%) e Ampholine (3%) nos pH desejados em água bidestilada.

Os primeiros experimentos de focalização isoelétrica foram feitos com o objetivo de se verificar a distribuição de pI das proteínas das amostras, sendo neste caso utilizado o pH entre 3,5 e 9,5.

Após estabelecidas essas condições para as amostras , a reidratação do gel foi feita com Ampholine com pH de 3,5 a 5,5.

#### Estudo preliminar para a definição de condições ótimas

Foram feitos estudos em que se variou a localização de aplicação das amostras e as quantidades a serem aplicadas.

Após a determinação de uma faixa de concentração aproximadamente ideal, foram feitos experimentos para se definir o ponto isoelétrico aproximado do inibidor, de modo a usar um Ampholine de faixa mais estreita. Esses experimentos indicaram que a melhor faixa de concentração é entre 100 e 400 g de extrato bruto para revelação por Coomassie, e 10 e 50 g para a revelação por atividade enzimática.

As condições de corrida seguiram inicialmente as instruções do fabricante (Tabela 1). As condições finais para a focalização isoelétrica estão modificadas (Tabela 2), e foram obtidas após variações de voltagem e amperagem nas três fases de focalização.

| SUPORTE UTILIZADO          | condições de corrida | Fase de IEF                |
|----------------------------|----------------------|----------------------------|
| CLEAN GEL IEF<br>PHARMACIA | 700V 6mA 8W 20 min   | pre IEF                    |
|                            | 2000V 7mA 7W 90 min  | separação                  |
|                            | 2000V 7mA 18W 10 min | concentração das<br>bandas |

Tabela 1. Condições elétricas para focalização isoelétrica de amostra de precipitado cetônico de *Bauhinia variegata* var. cándida .Recomendações do fabricante

| SUPORTE UTILIZADO          | condições de corrida      | Fase de IEF                |
|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| CLEAN GEL IEF<br>PHARMACIA | 500V 8mA 8W 45 min        | pre IEF                    |
|                            | 1200V 14mA 14W 105<br>min | separação                  |
|                            | 3000V 14mA 30W 30<br>min  | concentração<br>das bandas |

Tabela 2. Condições finais elétricas para focalização isoelétrica de amostra de precipitado cetônico e de amostra obtida da coluna de troca iônica de inibidor de tripsina de *Bauhinia variegata* var. cândida e var, lilás.

Determinação do ponto isoelétrico do inibidor de tripsina de *Bauhinia variegata* variedade cândida e do inibidor de tripsina de *Bauhinia variegata* variedade lilás

Foi feito uma focalização isoelétrica das amostras do material da coluna de troca iônica das amostras de inibidor de tripsina de *Bauhinia variegata* variedade cândida e de *Bauhinia variegata* variedade lilás, determinando-se o ponto isoelétrico de cada uma das bandas de inibidor através do marcador do ponto isoelétrico. Foram aplicadas 10 µg/20 µL da variedade cândida e 12,5 µg/20 µL da variedade lilás. A solução de reidratação do gel foi 80 µL de Ampholine pH 3,5 - 9,5, 700µl de Ampholine pH 3,5-5,5, 1,05 g de Sorbitol, água bidestilada até o volume de 10,5 mL. As condições de corrida encontram-se na Tabela 3:

| SUPORTE UTILIZADO       | CONDIÇÕES DE CORRIDA | FASE DE IEF             |
|-------------------------|----------------------|-------------------------|
| CLEAN GEL IEF PHARMACIA | 500V 4mA 4W 45 min   | pre IEF                 |
|                         | 1200V 7mA 7W 105 min | separação               |
|                         | 2000V 7mA 15W 15 min | concentração das bandas |

Tabela 3. Condições elétricas para focalização isoelétrica de amostra de coluna de troca iônica DEA-Sephadex A50 de inibidor de tripsina de *Bauhinia variegata* variedade cândida e *Bauhinia variegata* variedade lilás. O gel foi corado por Coomassie Blue.

### Revelação do gel

Após a corrida, o gel foi cortado com tesoura em duas metades, corado para padrão de proteínas (Coomassie Blue) e para padrão de inibidores de tripsina.

#### Revelação por Coomassie Blue

Metade do gel foi corado por Coomassie Blue segundo Blakesley et al. (1977). 1,0 g de Coomassie Brilliant Blue G-250 foi dissolvido em 250 mL de água destilada e misturado com 250 mL de ácido sulfúrico 2N (a solução deve ser filtrada para evitar distorções por resíduos). Misturou-se 9 partes dessa solução com 1 parte de hidróxido de potássio 10N. Adicionou ácido tricloroacético até a concentração final de 12% (p/v). Cobriu-se o gel com o reagente e foi deixado sob leve agitação durante 4 a 5 horas. Lavou-se com água destilada e deixou-se uma noite em água destilada.

#### Revelação para reação com inibidor

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

Estudo comparativo da faixa de pI entre inibidores de tripsina de sementes de 4 espécies de Bauhinia após focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida.

Foi feito um gel contendo o marcador de ponto isoelétrico e amostras do extrato de farinha de sementes de *Bauhinia variegata cándida*, *Bauhinia variegata lilás*, *Bauhinia pentandra*, *Bauhinia rufa*, *Bauhinia bauhinoides* e *Bauhinia halophylla*. As quantidades utilizadas para aplicação estão na tabela 4.

| Espécie                           | mg tripsina bovina inibida por g farinha de sementes | diluição da farinha de sementes (g/mL) | quantidade aplicada (mL) |
|-----------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------|
| <i>Bauhinia variegata cándida</i> | 2,21                                                 | 0,5g/3 mL                              | 3,05                     |
| <i>Bauhinia variegata lilás</i>   | 1,0                                                  | 0,5g/2 mL                              | 4,5                      |
| <i>Bauhinia pentandra</i>         | 32,9                                                 | 0,5g/3 mL                              | 1,0                      |
| <i>Bauhinia rufa</i>              | 5,0                                                  | 0,5g/3 mL                              | 7,0                      |
| <i>Bauhinia halophylla</i>        | 8,6                                                  | 0,5g/3 mL                              | 4,0                      |

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

#### Condições de corrida

A reidratação do gel consistiu em uma solução com sorbitol (10%) e Ampholine (3%) em água bidestilada, na faixa de pH entre 3,5 e 9,5.

As condições de corrida seguiram a mesma metodologia descrita anteriormente. Estas condições foram determinadas através de adaptações da recomendação do fabricante do gel (Tabela 5)

| SUPORTE UTILIZADO          | CONDIÇÕES DE CORRIDA   | FASE DE IEF             |
|----------------------------|------------------------|-------------------------|
| CLEAN GEL IEF<br>PHARMACIA | 500V 8mA 8W 45 min     | pre IEF                 |
|                            | 1200V 14mA 14W 105 min | separação               |
|                            | 3000V 14mA 30W 30 min  | concentração das bandas |

Tabela 5. Condições de corrida para focalização isoeétrica de amostra de extrato de farinha de sementes de inibidor de tripsina de *Bauhinias*.

## ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

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

### Preparação da amostra

40 nanomoles de cada inibidor , foram dissolvidos em água e acetonitrilo (1:1, v/v) e transferidos para pequenos tubos de reação em um volume de 20  $\mu$ L. Este foi

colocado dentro do frasco de reação, que possui tampa especial, para conexão com o sistema de vácuo e atmosfera de nitrogênio.

### Hidrólise ácida

As hidrólises foram efetuadas colocando-se no fundo do frasco de reação 100  $\mu$ L de uma solução de HCl 6M, onde foi adicionado 1 mg/mL, para evitar a formação de clorotirosina (20). Deve-se evitar que o ácido caia dentro dos tubos de reação. Em seguida foi feito vácuo próximo 1-2 Torr até início do borbulhamento do HCl. Fechado o vácuo deixou-se entrar nitrogênio (SS - Ultra puro) por 5 segundos. Repetiu-se estas etapas por três vezes sendo por último vácuo até 1 Torr, fechando o frasco de reação, que é removido para o forno de hidrólise a 105° C por 24 horas. Após este período os tubos de reação foram colocados a vácuo até 65 miliTorr, para secagem das amostras hidrolisadas.

### Derivatização

As amostras hidrolisadas foram lavadas com 20  $\mu$ L de uma solução de metanol: água: trietilamina (2:2:1, v/v). Cada tubo é agitado, centrifugado e colocado a evaporar em vácuo até a leitura de 65 miliTorr. Este procedimento remove sais e tampões, que possam estar absorvidos nos aminoácidos.

Uma solução fresca de derivatização foi preparada com metanol: trietilamina: água: feniltiocianato na relação 7:1:1:1 (V/V), sendo adicionado 20  $\mu$ L a cada tubo de reação e deixados a temperatura ambiente por um período de 30 minutos. Após derivatização as amostras foram secas à vácuo até a leitura de 50 miliTorr, para a completa remoção de todo o PITC. Cada amostra foi dissolvida em 50  $\mu$ L de uma solução 0.4 mM fosfato de sódio, cujo pH foi titulado a 7.4 com ácido fosfórico a 10%, sendo adicionado 5% de acetonitrilo.

A análise dos PTC aminoácidos foi realizada em HPLC, usando coluna C18/Bondapack em cromatografia de fase reversa com um gradiente linear de 20.5 minutos de 0 a 100% de acetonitrilo (60%). A identificação de cada aminoácido foi feita com uma corrida padrão de PTC aminoácidos .

## **DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA**

### Redução e alquilação radioativa

Ambos as formas dos inibidores de tripsina das duas variedades foram dissolvidas em tampão TRIS HCl 0.27 M. As proteínas sofreram redução branda com 10 microlitros de solução, recentemente preparada de ditioneitol (DTT, 10 mg/mL). Esta mistura foi incubada durante 60 minutos a 37° C com agitação à cada 10 minutos. As proteínas, reduzidas, foram alquiladas com ácido iodoacético. A reação foi efetuada à temperatura ambiente durante 60 minutos. Em ambos os casos as soluções após redução e alquilação foram dessalificadas em Sephadex- G 25 eluídas com 1 M ácido acético.

### Digestão enzimática

#### Digestão Enzimática com tripsina de BvtI-3

A proteína completamente reduzida e alquilada, foi dissolvida em bicarbonato de amônio 0,2M pH 8,3 e digerida com tripsina (10 mg/mL, relação enzima substrato 1:100) por um período de 24 horas a 37°C, em seguida liofilizada.

## Clivagem enzimática com Protease *Staphylococcus aureus* linhagem V<sub>8</sub>

A amostra de BvcTI-3 completamente reduzida e carboximetilada foi digerida com SV<sub>8</sub> protease, relação enzima substrato (1:30) em tampão fosfato de sódio, pH 7,8 por 18 horas a 37°C. A digestão foi interrompida com a liofilização do digesto.

### Obtenção dos peptídeos

O material anterior (2 mg) foi submetido à uma cromatografia de fase reversa. Foi utilizado para a purificação dos peptídeos do digesto do BvcTI-3 com tripsina, equipamentos Waters HPLC modelo ALC/GPC - 204, equipado com duas bombas Waters modelo 6000 com detector Waters 440. Foi usado injetor automático de amostra Waters modelo UK e coluna C18/Bondapack nas dimensões 0.39x30 cm. A cromatografia reversa usou um gradiente linear de 0 para 66% acetonitrilo em 0,1M de TFA em 80 minutos, à um fluxo de 2 mL por minuto. O monitoramento se deu a 220 nm de absorbância e a densidade ótica foi de 0.3. Os peptídeos que necessitam ser repurificados são recromatografados em HPLC no mesmo gradiente linear de 0 a 66% de acetonitrilo em 0,1 M de TFA, a um fluxo de 2 mL por minuto, e o monitoramento realizado a 220 nm de absorbância.

### Preparação e aplicação das amostras para determinação do N-terminal

40 nmoles dos inibidores de tripsina reduzidos, alquilados e liofilizados, foram ressuspensos em 30 microlitros de solução TFA 0,1M. Este material foi aplicado no sequenciador para a determinação da sequência de aminoácidos da porção amino terminal de cada forma de inibidor de tripsina de *B. variegata* cândida e *B. variegata* lilás obtidas da cromatografia de fase reversa em HPLC.

### Degradação automática de Edman

Este método foi utilizado para a determinação da porção N-terminal de ambos os inibidores e para o sequenciamento dos peptídeos do BvcTI digerido com tripsina.

O sequenciador automático de proteínas e peptídeos usa a técnica de degradação de Edman (Edman e Begg, 1967) para remover e identificar aminoácidos a partir da porção N-terminal de um polipeptídeo. Após a ativação de um filtro composto de papel e fibra de vidro, a proteína é covalentemente unida a este suporte e em seguida colocado na câmara de reação. Depois de cada ciclo degradativo, o aminoácido N-terminal é removido da cadeia polipeptídica na forma p7 3 derivada de anilintiazolinona (ATZ). O ATZ aminoácido é automaticamente transferido para uma segunda câmara de reação, onde ocorre a conversão para um derivado mais estável, na forma de feniltioidantoina do correspondente aminoácido (PTH). O PTH aminoácido é transferido para um sistema de cromatografia líquida de alta pressão onde a identificação é realizada em comparação a uma cromatografia de um padrão de PTH aminoácidos.

O sequenciador utilizado foi o modelo 477A, que utiliza, para a identificação dos PTH aminoácidos, um sistema de HPLC modelo 120A, ambos da Applied Biosystem.

Reagentes e tampão são transferidos para a câmara de reação e conversão por controle automático através de um micro processador, permitindo seqüências automáticas em alta sensibilidade entre 10 - 500 picomoles de proteína ou peptídeos. Os reagentes utilizados foram: R1, 5% fenilisotiocianato (PITC) em n-heptano; R2, 12.5% trimetilamina (TMA) em água; R3, ácido trifluoroacético (TFA), com 0.002% de ditiotretol (DTT); R4, 25% TFA em água com 0.01% DTT; R5,

acetonitrilo, com 0.001% DTT; S1 n-heptano; S2, etilacetato; S3, 1-clorobutano; S4, 20% acetonitrilo em água.

### Ativação do filtro

Um filtro de fibra de vidro é tratado com BioBrene, que fica adicionado ao filtro. Esta ativação é realizada na câmara de reação do sequenciador, onde é programado a realizar dois ciclos de reação, para a completa ativação e eliminar o excesso de reagentes, que poderiam interferir durante as etapas da degradação de Edman. A amostra, quando adicionada ao filtro, ficara imobilizada e pronta, para iniciar o sequenciamento. A capacidade máxima é cerca de 30 microlitros, quando necessário aplicar maior volume, secar o filtro com nitrogênio após cada aplicação.

## **DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR**

A massa molecular foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida, segundo método descrito anteriormente.

## **EDEMA**

A permeabilidade microvascular cutânea foi estudada em 3 coelhos albinos machos New Zeland ( 1.5 a 2.5 Kg), adquiridos na granja Criex, Mogi das Cruzes. O extravasamento de proteínas foi determinado em função do acúmulo local de albumina humana marcada com  $^{125}\text{I}$  em sítios de pele do animal (Willians,1979; Brain e Willians, 1985).

O coelho foi inicialmente anestesiado com pentobarbital sódico (Sagatal, 30-40 mg/Kg) através da veia marginal da orelha; quando necessário, doses de manutenção foram administradas. Em seguida a  $^{125}\text{I}$  albumina humana (2 mCi/Kg) e Azul de Evans (0,5 mL/Kg, 2,5 w/v) foram simultaneamente injetados pela via endovenosa. Os agentes edematogênicos (calicreína de pâncreas de porco, bradicinina e histamina) com 3 doses de inibidor de tripsina de sementes de *Bauhinia variegata* variedade cândida (10 mg, 100 mg e 500 mg) foram preparados em salina estéril e injetados intradermicamente em volumes de 100  $\mu\text{L}$  na pele dorsal do animal previamente depilada. Cada dose agonista foi injetada em seis diferentes sítios no dorso dos animais. Após 30 minutos, uma amostra de 5 mL de sangue foi coletada através de punção cardíaca e o animal foi sacrificado injetando-se intravenosamente uma sobre dose de Sagatal. A pele dorsal foi removida, os sítios injetados foram recortados (15 mm de diâmetro) e a radioatividade presente em cada amostra de tecido cutâneo foi contada em contador gama.

O edema formado de cada sítio foi expresso como volume de plasma extravasado em função da contagem obtida em 1 mL de plasma.

## 4. RESULTADOS

### ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS INIBIDORES DE PROTEINASES

#### Extração salina

A curva de dosagem da atividade inibitória sobre tripsina pelos extratos salinos (10%) das sementes de *Bauhinia variegata* var. cândida e da variedade lilás , foi determinada através da atividade residual de enzima no ensaio, e encontram-se nas Figuras 1 e 2. A concentração do inibidor foi calculada pela tangente da curva apresentada nas Figuras, e o valor obtido foi de 1,03 mg/mL e 2,11 mg/mL para BvcTI (Inibidor de tripsina de sementes de *Bauhinia variegata* variedade cândida) e BvITI (inibidor de tripsina de sementes de *Bauhinia variegata* variedade lilás), respectivamente.

#### Fracionamento cetônico

O extrato protéico obtido foi fracionado por acetona (80%, v/v). A representação das curvas de inibição por tripsina pelos BvcTI e BvITI (inibidor de tripsina de semente de *Bauhinia variegata* var cândida e inibidor de tripsina de *Bauhinia variegata* var. lilás, respectivamente ) encontram-se nas Figuras 3 e 4 .

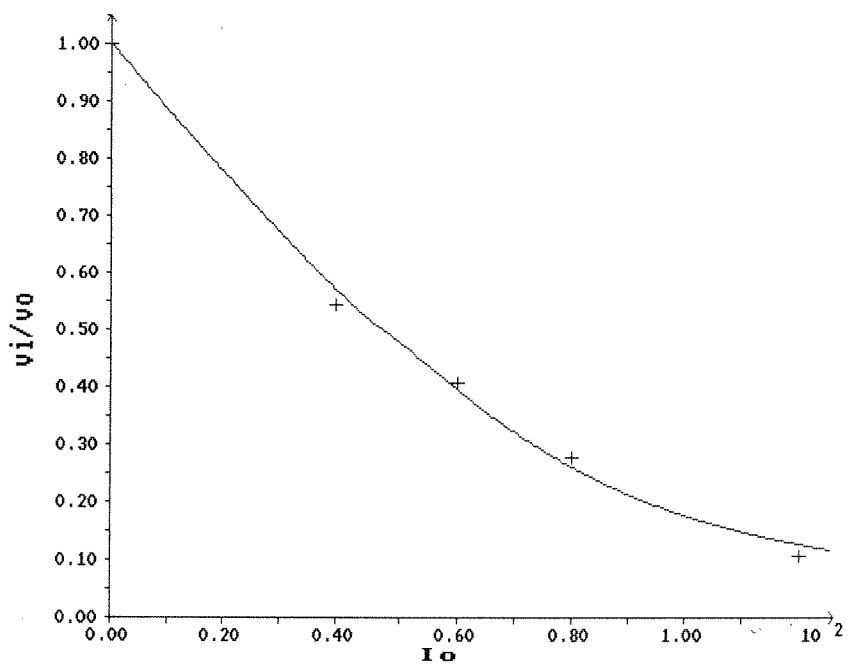


Figura. 1. Curva de inibição de tripsina pelo extrato salino das sementes de *Bauhinia variegata* var c ndida, onde  $v_i/v_0$    a atividade residual e  $I_0$    volume de extrato salino ( $\mu\text{L}$ ).

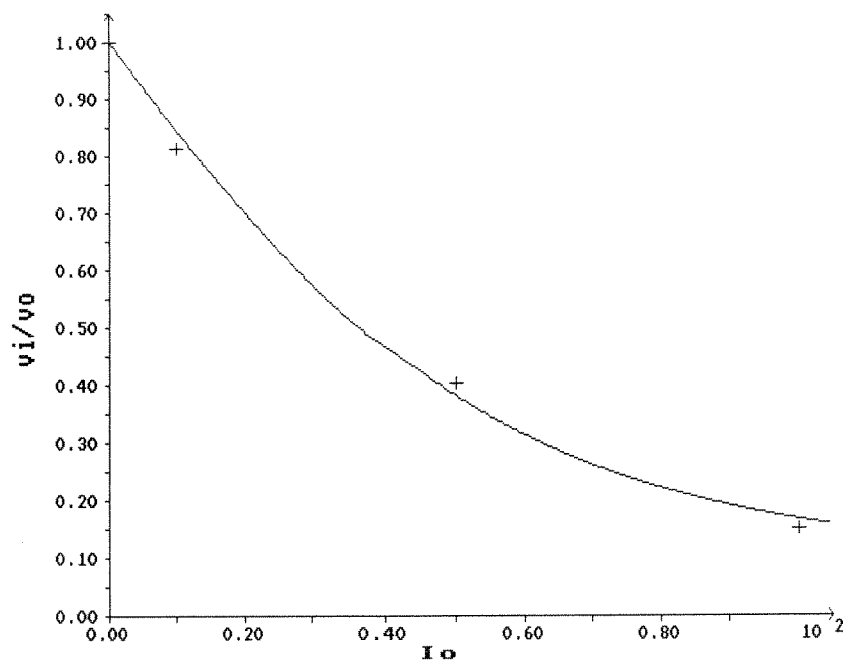


Figura 2. Curva de inibição de tripsina pelo extrato salino de *Bauhinia variegata* var lilás , onde  $v_i/v_0$    a atividade residual e  $I_0$    volume de extrato salino ( $\mu\text{L}$ )..

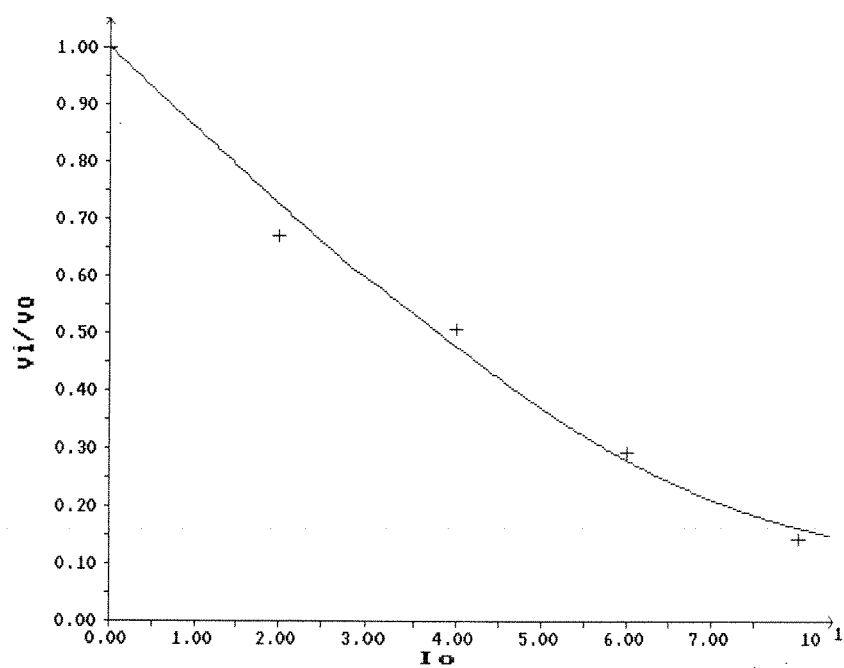


Figura 3. Curva de inibição de tripsina pelo precipitado cetônico de BvcTI, onde  $v_i/v_0$  representa a atividade residual e  $I_0$  é volume de precipitado ressuspenso em água destilada ( $\mu\text{L}$ ).

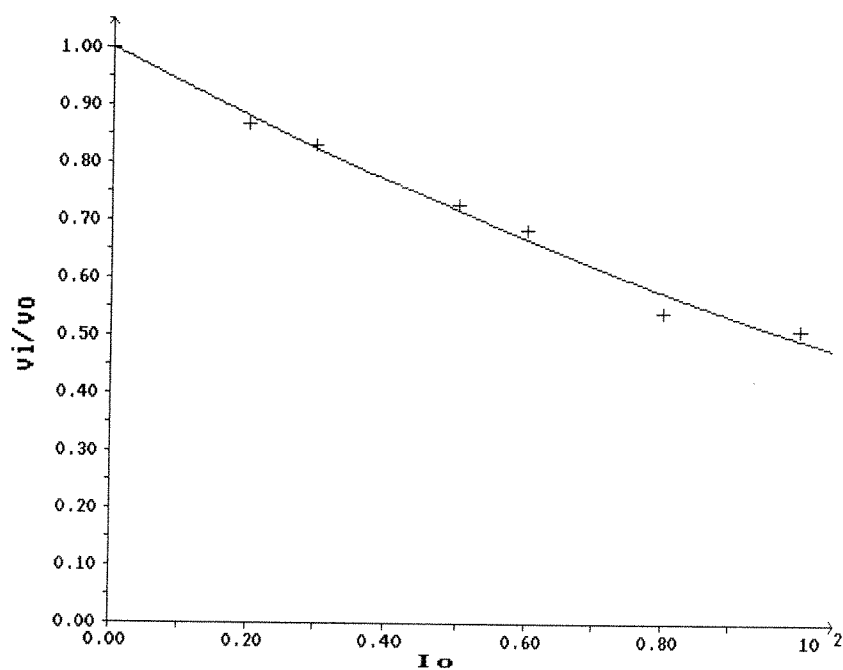


Figura 4. Curva de inibição de tripsina pelo precipitado cetônico de BvITI, onde  $v_i/v_0$  é a atividade residual e  $I_0$  é volume de precipitado ressuspenso em água destilada ( $\mu\text{L}$ ).

### "Batch" em resina de troca iônica DEAE Sephadex A50

O material obtido do fracionamento cetônico, ressuspendido e submetido à um "Batch" em resina de troca iônica DEAE Sephadex A50, está representado nas Figuras 5 e 6 para BvcTI e BvITI, respectivamente, as quais mostram a curva de inibição da fração ativa do material eluído nesta etapa.

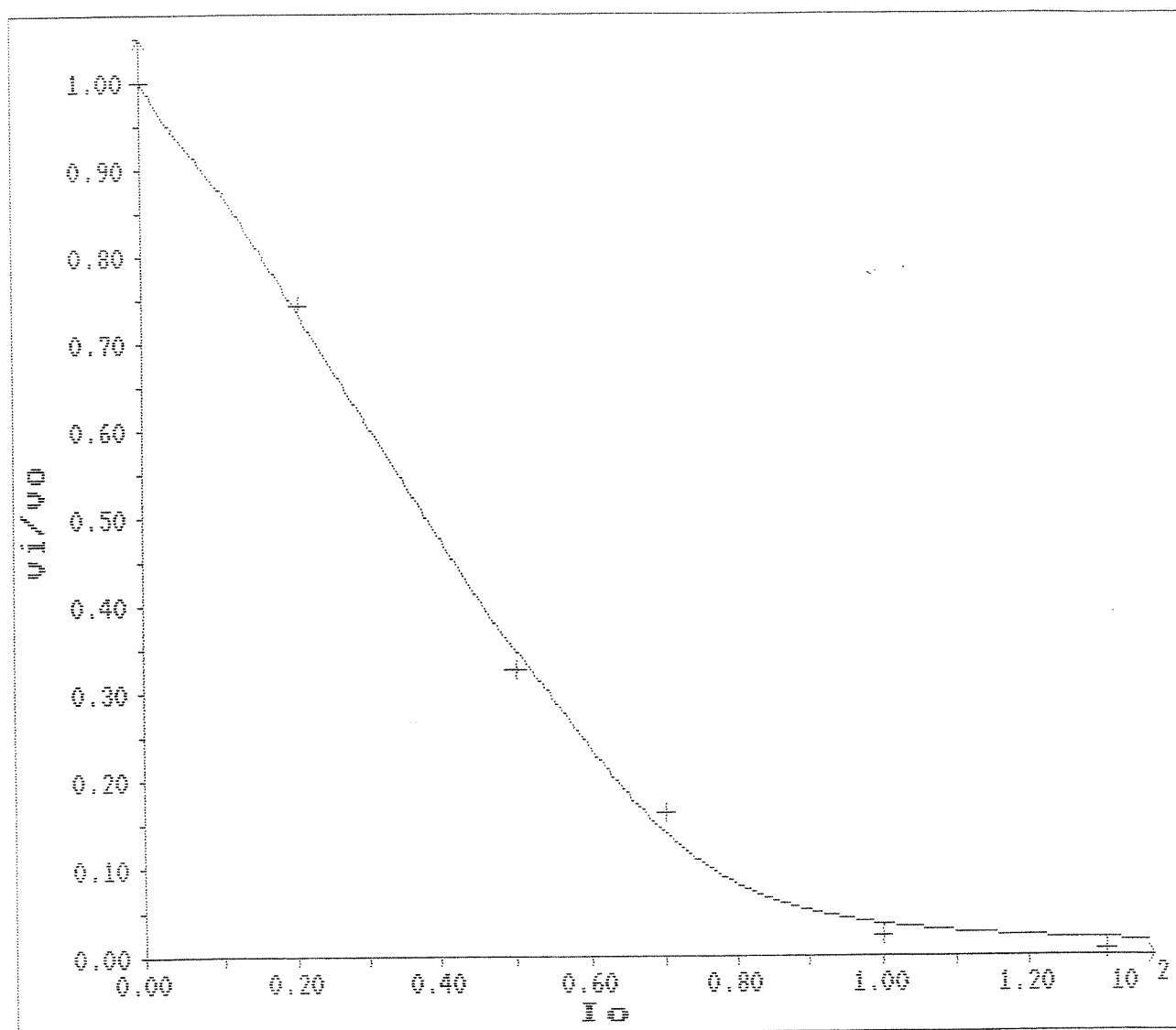


Figura 5. Curva de inibição de tripsina pelo "pool" ativo do "Batch" em resina de DEAE Sephadex A50 de BvcTI, onde  $v_i/v_0$  é a atividade residual e  $I_0$  é volume de precipitado ressuspendido em água destilada ( $\mu\text{L}$ ).

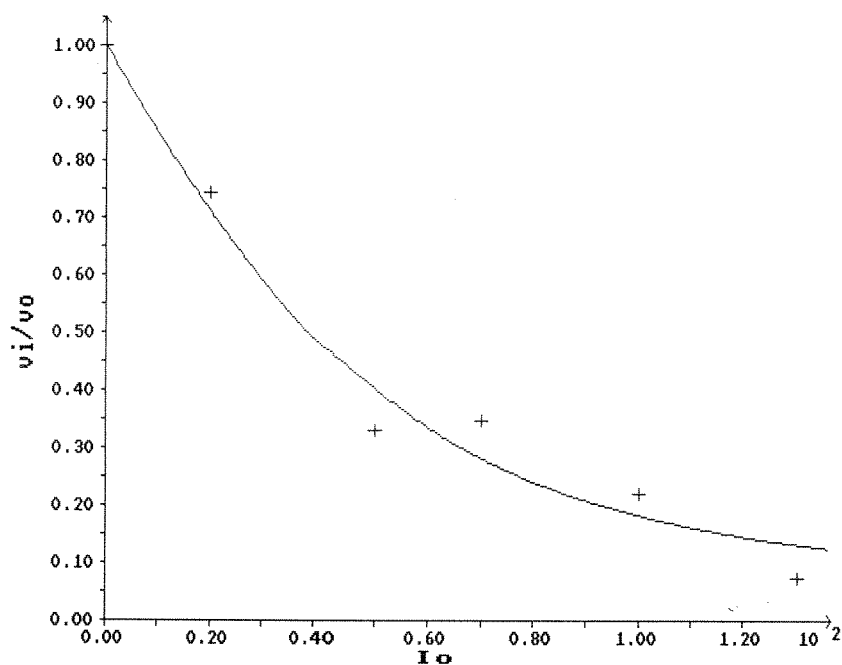


Figura 6. Curva de inibição de tripsina pelo "pool ativo" do "Batch" em resina de DEAE Sephadex A50 de BvITI, onde  $v_i/v_0$  é a atividade residual e  $I_0$  é volume de precipitado ressuspendido em água destilada ( $\mu\text{L}$ ).

### Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A50

Nesta primeira cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A50 (Pharmacia) acoplada ao FPLC (Pharmacia), temos para ambos os inibidores BvcTI e BvITI o mesmo perfil de eluição (Figura 7), onde a fração com atividade biológica BvcTI encontra-se no "pool" 2.

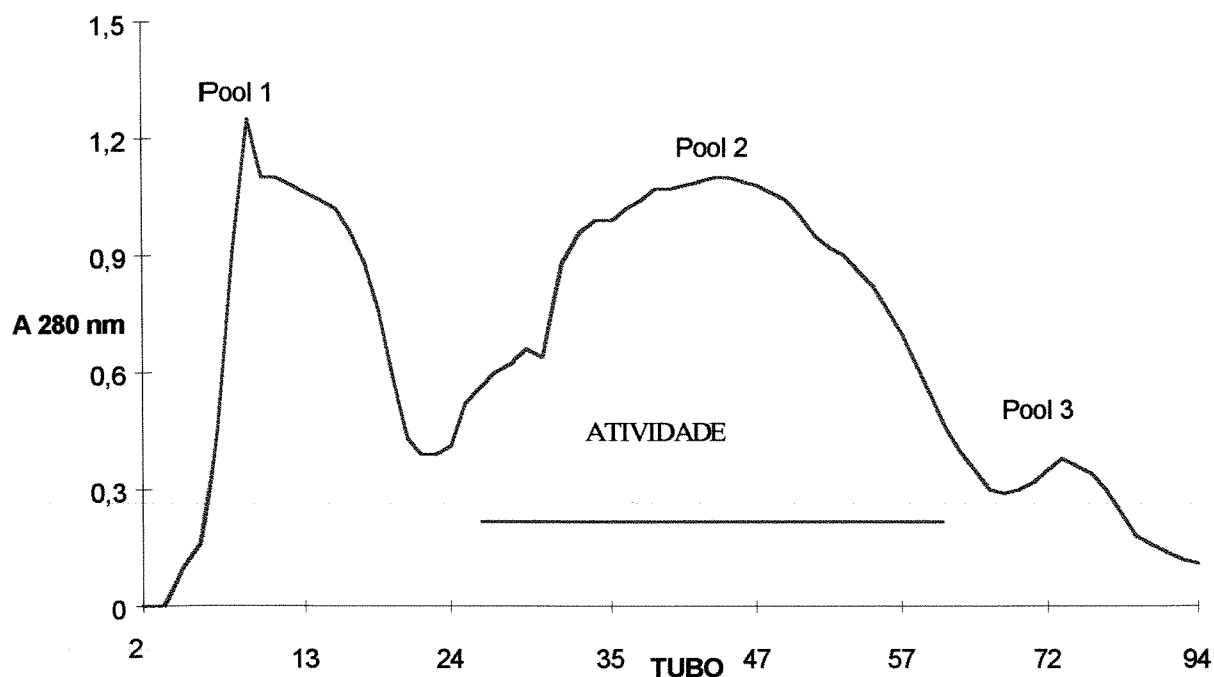


Figura 7. Cromatografia em DEAE-Sephadex A50 BvcTI. Coluna pré-montada Pharmacia de DEAE-Sephadex A50, acoplada ao FPLC (Pharmacia). Tampão de Equilíbrio: Tris-HCl 0,05M, pH 8,0. Eluição: gradiente linear de 0-0,6M NaCl, fluxo de 0,5 mL/min, monitoramento a 280 nm. Fração ativa "pool" 2, "pool" 1 e "pool" 3 foram descartados.

## Cromatografia de Exclusão Molecular

Foram realizadas duas cromatografias de exclusão molecular (Sephadex G-75 e Superose 12) com o objetivo de purificar o material proveniente da cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephadex A50.

### Cromatografia de Exclusão Molecular em coluna de Sephadex G-75

Nesta etapa de purificação, a fração ativa ("pool" 2), proveniente da cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephadex A50), foi submetida em cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-75) apresentando o mesmo perfil cromatográfico para os inibidores provenientes das variedades cândida (BvcTI) e lilás (BvITI). Foram obtidos três picos protéicos, e a atividade inibitória

sobre tripsina localizada somente no pico 2, o qual denominamos de “pool “2 e está demarcado com uma linha na base do pico como mostrado na Figura 8.

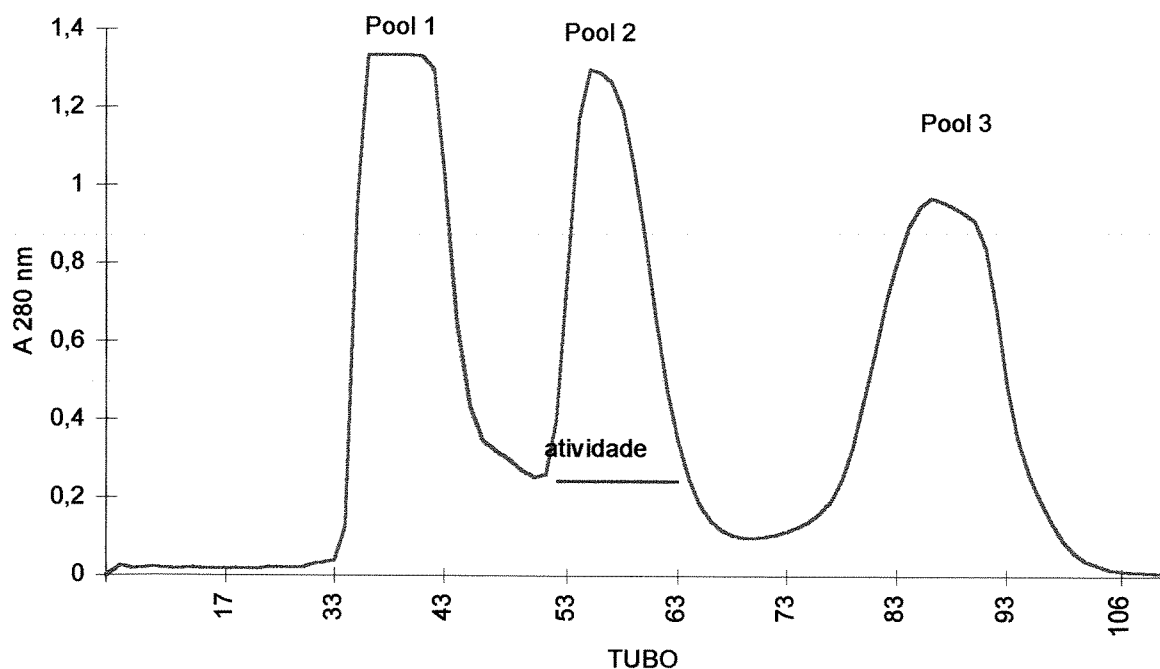


Figura 8. Cromatografia em Sephadex G-75 de BvcTI. Coluna de vidro (168 cm x 76,5 cm). Tampão de equilíbrio TRIS HCl 0,1M pH 8,0. Amostra aplicada “pool “2 DEAE-Sephadex A50. Fluxo de 21 mL/hora. Frações coletadas de 2 mL. Temperatura ambiente. Fração ativa “pool “2.

### Cromatografia de exclusão molecular em Superose 12

Nesta etapa de purificação, a fração ativa proveniente da cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75, é cromatografada em coluna de Superose 12 HR 10/30 (exclusão molecular), apresentando o mesmo perfil cromatográfico para BvcTI e BvITI. Foram obtidos três picos protéicos, sendo o pico de maior absorbância em A280, o que contém a fração ativa (“pool“ 2) (Figura 9).

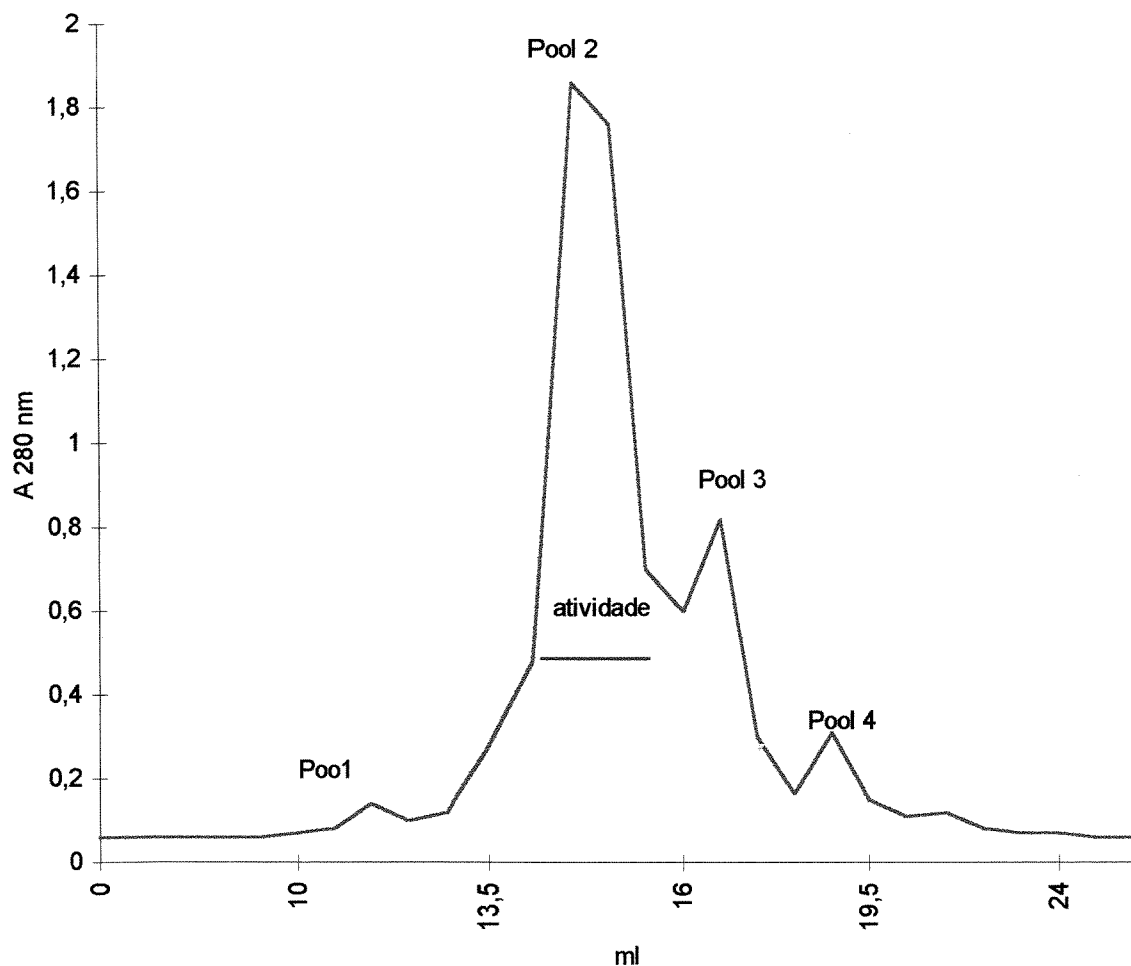


Figura 9. Cromatografia em Superose 12. Coluna: Superose 12 H/R 10/30 Pharmacia. Tampão de equilíbrio: TRIS HCl 0,05M, pH 8,0. Absorbância: 280 nm. Fluxo: 0,5 mL/min. Registro do papel 0,5 cm/mL. Tempo de corrida: 60 minutos. Temperatura ambiente. Fração ativa: " pool " 2. " pool " 1, 3 e 4 foram descartados.

### Controle do rendimento de Purificação

O controle do rendimento da purificação pode ser observado nas Tabelas de Purificação para ambos inibidores. O rendimento de purificação foi de 8,5 % para BvITI (Tabela 6) e de 4,1 % para BvcTI (Tabela 7). BvITI foi purificada 73 vezes, com uma atividade específica de 0,73, enquanto BvcTI foi purificada 1055 vezes, com uma atividade específica de 0,58.

| Etapa                 | Volume (mL) | Prot* (mg/mL) | Prot. Total (mg) | Ativ (U/mL) | Ativ Total (U) | Ativ Espec (U/mg) | Purific (vezes) | RENDIM (%) |
|-----------------------|-------------|---------------|------------------|-------------|----------------|-------------------|-----------------|------------|
| Extrato salino        | 286         | 37            | 10600            | 0.42        | 120            | 0.01              | 1               | 100        |
| Precip. acetônica     | 15.         | 67.3          | 1010             | 4.13        | 62             | 0.06              | 6               | 51.6       |
| Troca iônica          | 61          | 8.8           | 537              | 0.87        | 53             | 0.1               | 10              | 44.2       |
| Exc.molec G75         | 47          | 1.25          | 59               | 0.4         | 18.8           | 0.32              | 32              | 16         |
| Exc.molec Superose 12 | 13.4        | 1.04          | 14               | 0.76        | 10.2           | 0.73              | 73              | 8.5        |

Tabela 6. Tabela de purificação de BvITI. \* A proteína foi determinada por medida de absorvância em 280 nm.

| Etapa             | Volume (mL) | Prot* (mg/mL) | Prot. Total (mg) | Ativ (U/mL) | Ativ Total (U) | Ativ Espec (U/mg) | Purific (vezes) | RENDIM (%) |
|-------------------|-------------|---------------|------------------|-------------|----------------|-------------------|-----------------|------------|
| Extrato salino    | 336         | 50.7          | 17035            | 0.28        | 94             | 0.0055            | 1.00            | 100        |
| Precip. acetônica | 15          | 61.5          | 922.5            | 4.90        | 73.5           | 0.08              | 14.5            | 78         |
| Troca iônica      | 30          | 7.84          | 235.2            | 0.73        | 22             | 0.093             | 16.9            | 23.4       |
| Exc.mole c. G75   | 74          | 0.35          | 25.9             | 0.14        | 10.4           | 0.40              | 72.7            | 11         |
| Exc.mole          | 11          | 0.6           | 6.6              | 0.35        | 3.9            | 0.58              | 1055            | 4.1        |

Tabela 7. Tabela de purificação de BvcTI. \* A proteína foi determinada por medida de absorvância em 280 nm.

**Purificação das formas de inibidor de tripsina de *B. variegata* variedade cândida (BvCTI) e *B. variegata* var. lilás (BvITI).**

As Figuras 10 e 11 mostram o cromatograma da purificação das 3 formas BvCTI e BvITI, respectivamente. O gradiente utilizado foi um gradiente linear de 0 à 66% de acetonitrila em 0,1% de TFA. Estes resultados mostram os 3 picos principais das formas de BvCTI e BvITI, sendo portanto, possível a separação.

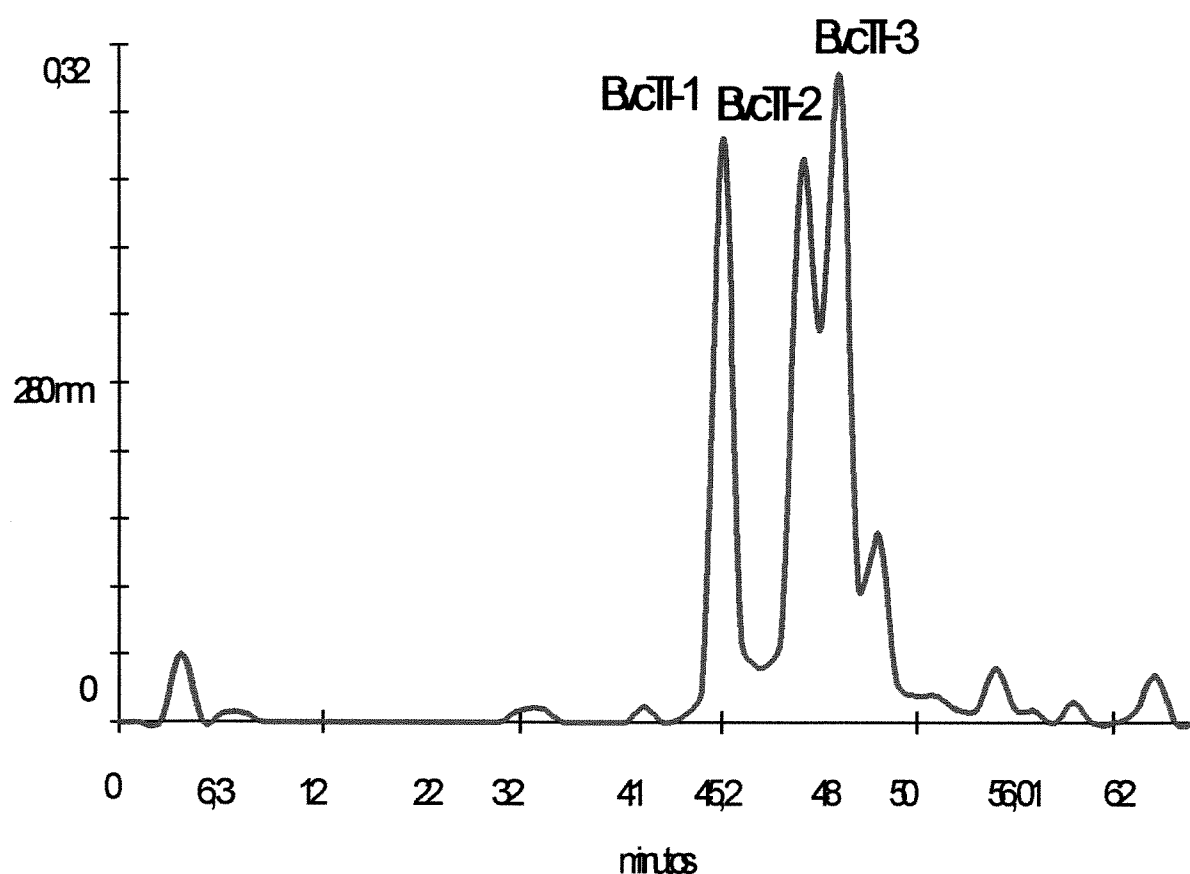


Figura 10. Cromatografia de fase reversa em HPLC do "pool" 2 da cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superose 12 de BvCTI.

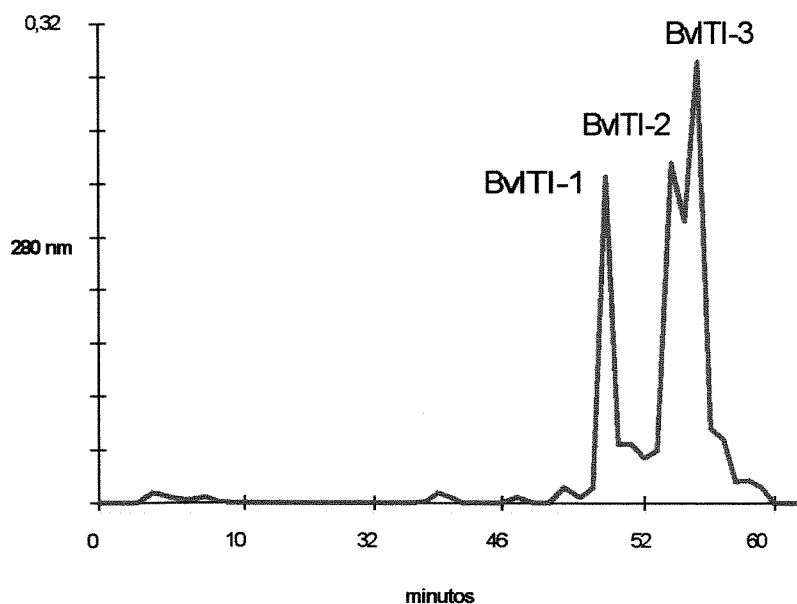


Figura 13. Cromatografia de fase reversa em HPLC do "pool" 2 da cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superose 12 de BvTI .

## DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE INIBIÇÃO

A determinação das constantes de inibição através da constante de dissociação do complexo enzima-inibidor ( $K_i$ ), foram feitas seguindo-se o modelo proposto por Morrison (Knight, 1986), adaptado a um programa de cinética enzimática em computador, sendo o valor numérico calculado pelo programa ENZIFITER, e estão relacionados na Tabela 8. Foram feitos os ensaios com tripsina, quimotripsina, calicreína do plasma humano, plasmina e fator Xa.

| ENZIMA          | $K_i$ |       |
|-----------------|-------|-------|
|                 | BVcTI | BVITI |
| TRIPSINA BOVINA | 0.69  | 0.12  |
| HuPK            | 4.5   | 0.79  |
| FATOR Xa        | n.i.  | n.i.  |

Tabela 8.  $K_i$  de BvcTI e BvITI, onde:  $K_i$  é constante de inibição em  $10^{-8}M$ ; HuPK é calicreína de plasma humano e n.i. é ausência de inibição.

# DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO INIBIDOR DE TRIPSINA E QUIMOTRIPSINA DE SEMENTES DE *B. variegata* var. cãndida E var, lilás

Podemos ver, nas Tabelas 9 e 10 que as quantidades de quimotripsina inibidas são maiores que a de tripsina nas amostras de extrato da farinha de sementes (quantidade de enzimas inibidas por 1 g de extratos ou frações purificadas das duas variedades de *B. variegata*) ., porém essa relação inverte durante a purificação, indicando a presença de um inibidor específico para quimotripsina na farinha. Há uma inversão na atividade inibitória quando são usadas tripsina e quimotripsina porcina. a variação é mais evidente em relação à quimotripsina que é menos inibida efetivamente.

| PREPARAÇÃO | BT (mg/g) | PURIFICAÇÃO | BCT (mg/g) | PURIFICAÇÃO | PT (mg/g) | PURIFICAÇÃO | PCT (mg/g) | PURIFICAÇÃO | HT (mg/g) | PURIFICAÇÃO | HCT (mg/g) | PURIFICAÇÃO |
|------------|-----------|-------------|------------|-------------|-----------|-------------|------------|-------------|-----------|-------------|------------|-------------|
| E.S. lilás | 1.0       | 1           | 2.2        | 1           | 0.9       | 1           | 1.2        | 1           | 3.0       | 1           | 0.5        | 1           |
| P.C. lilás | 38.8      | 38.8        | 21.0       | 9.5         | 40.1      | 44.5        | 13.3       | 11.1        | 42.8      | 14.3        | 15.3       | 30.6        |
| I.EX.lilas | 477.9     | 477.9       | 142.2      | 64.6        | 431.9     | 479.9       | 139.5      | 116.2       | 811.5     | 270.3       | 115.6      | 231.2       |

Tabela 9. Atividade inibitória de tripsina e quimotripsina em extrato de sementes de *Bauhinia variegata* var. lilás ;; E.S. lilás - extrato bruto de sementes de *B. variegata* var. lilás; P.C. lilás - precipitado cetônico do extrato bruto de sementes de *B. variegata* var. lilás; I.EX. lilás - material obtido da coluna de troca iônica DEAE-Sephadex A50 de *B. variegata* var lilás; n.d. não determinado; BT- tripsina de pâncreas bovino inibida por 1 g de material; BCT- quimotripsina de pâncreas bovino inibida por 1 g de material; PT- tripsina de pâncreas porcino inibida por 1 g de material; PCT- quimotripsina de pâncreas porcino inibida por 1 g de material; HT- tripsina de pâncreas humano inibida por 1 g de material; HCT- quimotripsina de pâncreas humano inibida por 1 g de material.

| PREPARAÇÃO    | BT (mg/g) | PURIFICAÇÃO | BCT (mg/g) | PURIFICAÇÃO | PT (mg/g) | PURIFICAÇÃO | PCT (mg/g) | PURIFICAÇÃO | HT (mg/g) | PURIFICAÇÃO | HCT (mg/g) | PURIFICAÇÃO |
|---------------|-----------|-------------|------------|-------------|-----------|-------------|------------|-------------|-----------|-------------|------------|-------------|
| E.S. cândida  | 2.2       | 1           | 2.9        | 1           | 2.8       | 1           | 1.2        | 1           | 3.5       | 1           | 0.9        | 1           |
| P.C. cândida  | 91.6      | 41.6        | 27.7       | 9.5         | 72.6      | 25.9        | 24.8       | 20.7        | 55.5      | 15.9        | 19.8       | 22.0        |
| I.EX. cândida | 421.1     | 191.4       | 249.5      | 86.0        | 405.4     | 144.8       | 109.4      | 91.2        | 773.4     | 221.0       | 205.3      | 228.1       |

Tabela 10. Atividade inibitória de tripsina e quimotripsina em extrato de sementes de *Bauhinia variegata* var. cândida; E.S. cândida - extrato bruto de sementes de *B. variegata* var. cândida, P.C. cândida - precipitado cetônico do extrato bruto de sementes de *B. variegata* var. cândida;; I.EX. cândida - material obtido da coluna de troca iônica DEAE-Sephadex A50 de *B. variegata* var. cândida;; n.d. não determinado; BT- tripsina de pâncreas bovino inibida por 1 g de material; BCT- quimotripsina de pâncreas bovino inibida por 1 g de material; PT- tripsina de pâncreas porcino inibida por 1 g de material; PCT- quimotripsina de pâncreas porcino inibida por 1 g de material; HT- tripsina de pâncreas humano inibida por 1 g de material; HCT- quimotripsina de pâncreas humano inibida por 1 g de material.

A atividade específica para tripsina aumenta nas etapas de purificação do inibidor (Tabelas 11 e 12), porém o aumento que é igual na fase de precipitação por acetona, é diferente na purificação por DEAE- Sephadex , no caso de cândida a purificação até esse estágio é cerca de 190 vezes e no caso de lilás é cerca de 480 vezes.

Podemos observar que a atividade específica para tripsina porcina aumenta do extrato bruto para o precipitado cetônico, porém o aumento da etapa de purificação do precipitado cetônico para a troca iônica não é significativo. No caso da tripsina humana há uma diminuição na atividade específica da fase do extrato bruto para precipitado cetônico, e um aumento de 1,35 vezes para a variedade cândida e 2,5 vezes para a variedade lilás, na preparação de troca iônica em relação ao precipitado cetônico.

| PREPARAÇÃO CÂNDIDA        | RELAÇÃO BT/BCT | ATIVIDADE RELATIVA | RELAÇÃO PT/PCT | ATIVIDADE RELATIVA | RELAÇÃO HT/HCT | ATIVIDADE RELATIVA |
|---------------------------|----------------|--------------------|----------------|--------------------|----------------|--------------------|
| Extrato bruto de sementes | 0.76           | 1                  | 2,33           | 1                  | 3,89           | 1                  |
| Precipitado cetônico      | 3.31           | 4,36               | 2,93           | 1,26               | 2,80           | 0,72               |
| troca iônica              | 1.69           | 2,22               | 3,71           | 1,59               | 3,77           | 0,97               |

Tabela 11 . Relação de inibição de tripsina e quimotripsina em diversas preparações de inibidor de tripsina de *B. variegata* var. cândida .

| PREPARAÇÃO LILÁS          | RELAÇÃO BT/BCT | ATIVIDADE RELATIVA | RELAÇÃO PT/PCT | ATIVIDADE RELATIVA | RELAÇÃO HT/HCT | ATIVIDADE RELATIVA |
|---------------------------|----------------|--------------------|----------------|--------------------|----------------|--------------------|
| Extrato bruto de sementes | 0.45           | 1                  | 0,75           | 1                  | 6,00           | 1                  |
| Precipitado cetônico      | 1.88           | 4,18               | 3,02           | 4,03               | 2,80           | 0,47               |
| troca iônica              | 3.36           | 7,47               | 3,10           | 4,13               | 7,02           | 1,17               |

Tabela. 12. Relação de inibição de tripsina e quimotripsina em diversas preparações de inibidor de tripsina de *B. variegata* lilás

## ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA PAGE-SDS

O grau de pureza das frações obtidas na purificação foi acompanhado através de eletroforese PAGE-SDS, e a determinação da massa molecular dos BvcTI e BvITI foi efetuada pelo mesmo método. Na Figura 12 temos em a- o padrão de massa molecular (MW-SDS 70- SIGMA); em b- mostra as proteínas contidas no "Pool " 2, da purificação do extrato salino em DEAE-Sephadex A50, cujas bandas estão localizadas entre os pesos moleculares 60.000 e 20.000 do marcador; em c- mostra as proteínas contidas no "pool" 2 da cromatografia em Sephadex G-75, (provenientes da cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A50), cujas bandas estão entre os pesos moleculares de 43.000 e 20.000; em d- mostram material aplicado do "pool" 2 proveniente da cromatografia de exclusão molecular em Superose 12.

A fração obtida na etapa de purificação na resina exclusão molecular Superose 12 foi analisada em eletroforese em gel de poliacrilamida na forma nativa e reduzida (Figura 13). Em a temos o padrão de massa molecular . Em b e c temos a fração de BvITI e BvcTI na forma nativa, respectivamente e em d e e temos , respectivamente, BvITI e BvcTI na forma reduzida. Em ambas as variedades tanto na forma nativa , como na reduzida, há uma única banda de massa molecular entre 24.000 e 18400.

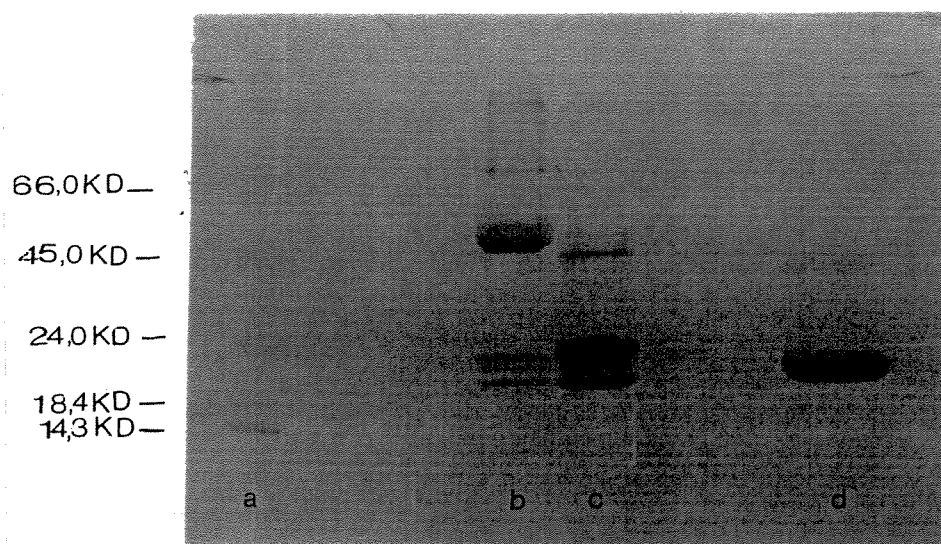


Figura 12. Eletroforese em gel de gradiente ,PAGE-SDS BvCTI(10 - 20 %). a- Padrão de massa molecular (MW-SDS-SIGMA), lisosima (P.M. 14300),b-lactoglobulina (P.M. 18400),tripsinogênio de pâncreas bovino tratado com PMSF (P.M. 24000), pepsina (P.M. 34700), ovoalbumina ( P.M. 45000), albumina bovina ( P.M. 66000). b- " pool "2 da cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A50 do extrato salino . c- " pool "2 da cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75, do material proveniente da Cromatografia de troca iônica (DEAE- Sephadex A50). d , "pool 2" da cromatografia de exclusão molecular em Superose 12 ,obtido a partir da repurificação do "pool "2 da Sephadex G-75.

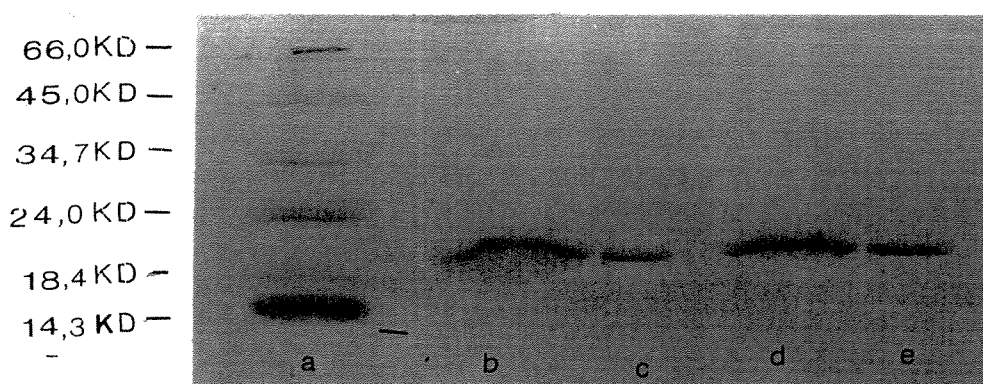


Figura 13. Eletroforese em gel de gradiente, PAGE-SDS (10 - 20 %). a- Padrão de massa molecular (MW-SDS-SIGMA), lisosima(P.M. 14300), b-lactoglobulina (P.M. 18400), tripsinogênio de pâncreas bovino tratado com PMSF (P.M. 24000), pepsina (P.M. 34700), ovoalbumina ( P.M. 45000), albumina bovina ( P.M. 66000). b-Fração ativa (" pool " 2) da cromatografia de exclusão molecular em Superose 12 do BvITI na forma nativa. c-Fração ativa (" pool " 2) da cromatografia de exclusão molecular em Superose 12 do BvCTI na forma nativa. d-Fração ativa (" pool " 2) da cromatografia de exclusão molecular em Superose 12 do BvCTI na forma reduzida. e- Fração ativa (" pool " 2) da cromatografia de exclusão molecular em Superose 12 do BvITI na forma reduzida.

## ANÁLISE AUTOMÁTICA DE AMINOÁCIDOS

A análise automática de aminoácidos dos inibidores de tripsina BvcTI-3 e BvITI-3, feitos pelo analisador automático de aminoácidos - sistema Pico Tag, da Waters, estão mostradas nas tabela 13.

Podemos observar 4 e 2 resíduos de cisteína em BvcTI-3 e BvITI-3, respectivamente, indicando a presença de uma ponte dissulfeto. Além disso há somente 1 resíduo de Metionina para ambos os inibidores analisados.

|                |                      | BvcTI-3                    | BvITI-3                    |
|----------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|
| amino<br>ácido | PM<br>resíduo<br>(g) | valor<br>integral<br>molar | valor<br>integral<br>molar |
| ASX            | -                    | 18                         | 29                         |
| GLX            | -                    | 13                         | 16                         |
| SER            | 87.09                | 14                         | 15                         |
| GLI            | 57.07                | 15                         | 16                         |
| HIS            | 137.16               | 0                          | 3                          |
| ARG            | 156.21               | 12                         | 17                         |
| TRE            | 111.12               | 14                         | 9                          |
| ALA            | 71.09                | 6                          | 13                         |
| PRO            | 97.13                | 11                         | 3                          |
| TYR            | 114.15               | 4                          | 4                          |
| VAL            | 163.15               | 11                         | 13                         |
| MET            | 131.21               | 1                          | 1                          |
| CIS            | 222.31               | 4                          | 2                          |
| ILE            | 113.17               | 10                         | 10                         |
| LEU            | 113.17               | 14                         | 14                         |
| FEN            | 147.19               | 9                          | 7                          |
| LIS            | 128.19               | 8                          | 4                          |
| TOTAL          |                      | 167                        | 174                        |

TABELA 13. Análise de aminoácidos do inibidor de tripsina de sementes de *Bauhinia variegata* var. cândida - BvcTI-3.

## REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO RADIOATIVA

Os inibidores reduzidos e alquilados foram separados dos reagentes em coluna Sephadex G-25. O monitoramento da proteína foi por absorbância à 280 nm. Os resultados mostraram que a proteína saiu em um único pico e estão representados nas Figuras 14 para BvcTI e 15 para BvITI.

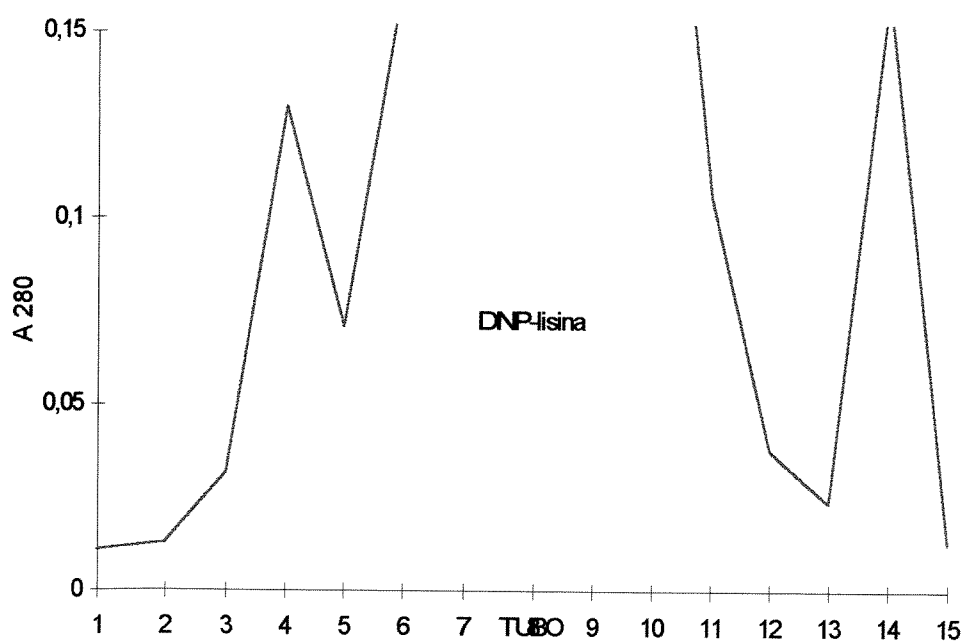


Figura 14. Dessalificação da amostra de BvcTI-3 reduzida e alquilada. Monitoramento à A<sub>280</sub> nm. Tampão de eluição ácido acético 30%.

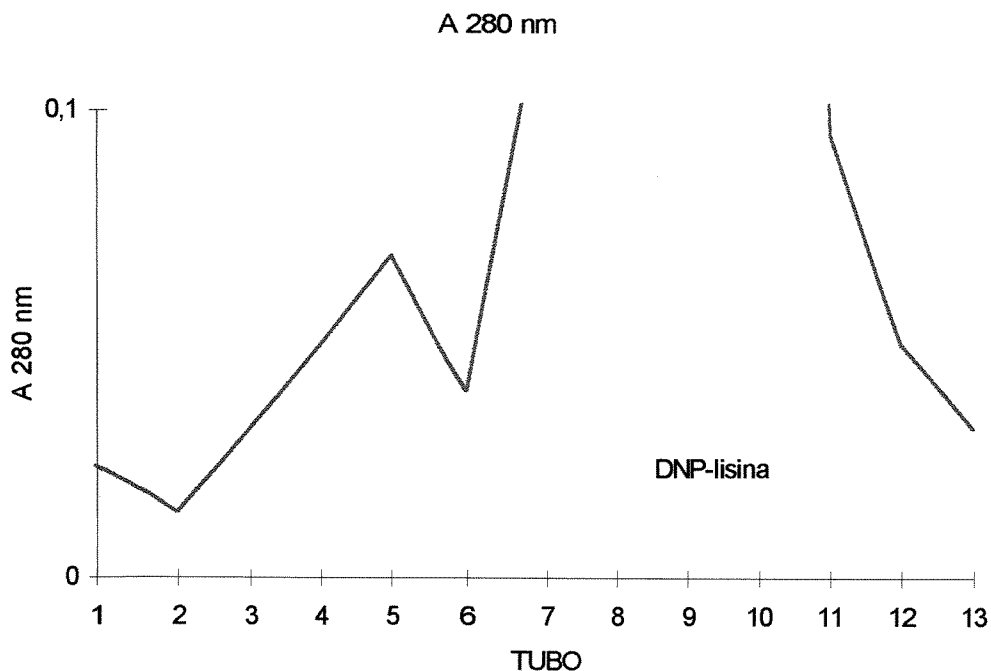


Figura 15. Dessalificação da amostra de BvTI-3 reduzida e alquilada. Monitoramento à A 280 nm. Tampão de eluição ácido acético 30%.

## DIGESTÃO ENZIMÁTICA E PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

1 mg do inibidor de tripsina BvcTI-3, clivado com SV8 protease, liofilizado e ressuspendido em 200  $\mu$ L de solvente A (0,1M TFA), foi submetido à cromatografia de fase reversa em sistema HPLC, utilizando-se coluna  $\mu$ - Boundapak C18. O cromatograma (Figura 16) mostrou 11 picos majoritários, dos quais o material de 5 picos foram direto para seqüência e os outros foram repurificados no mesmo sistema.

1 mg do inibidor de tripsina BvcTI-3 foi hidrolisado por tripsina por um período de 24 horas à 37<sup>0</sup> C e submetido à uma cromatografia de fase reversa em coluna C18, em gradiente de acetonitrila (0-66 %), em HPLC. A digestão tríptica do BvcTI-3 resultou em 19 picos principais, como mostra a Figura 17. Os peptídeos que necessitaram de repurificação foram repurificados no mesmo sistema.

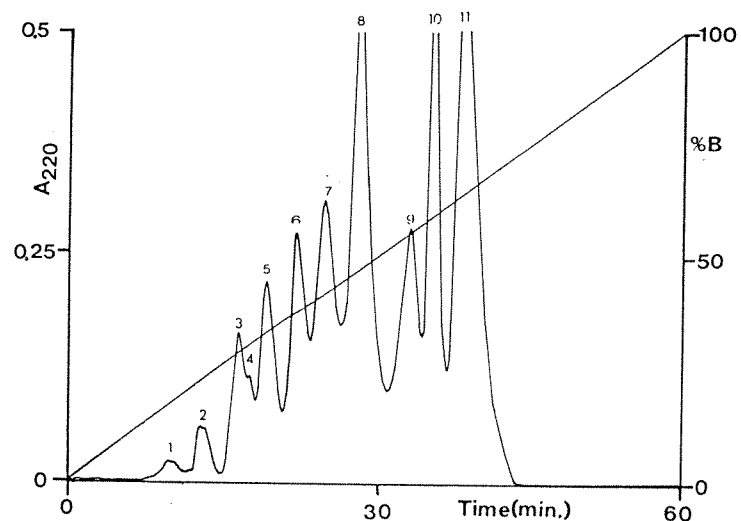


Figura 16. Cromatografia de fase reversa em sistema HPLC para purificação dos peptídeos produzidos a partir do inibidor de tripsina BvcTI clivado com *S. aureus* V8 protease. A amostra, 1 mg do digesto, foi fracionada em coluna analítica C18  $\mu$ -Bondapak de 0.39 cm x 30 cm. A eluição se deu em gradiente linear de 0-100% de Buffer B, pH 2,5. Fluxo 1 mL- por minuto.

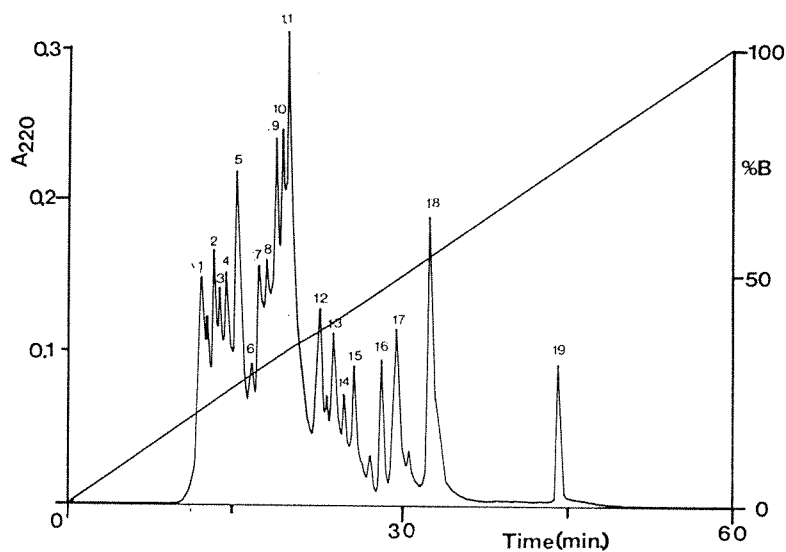


Figura 17. Cromatografia de fase reversa em HPLC do digesto triptico de BvcTI-3. A amostra, 1 mg do digesto, foi fracionada em coluna analítica C18  $\mu$ -Bondapak de 0.39 cm x 30 cm. A eluição se deu em gradiente linear de 0-100% de Buffer B, pH 2,5. Fluxo 1 mL- por minuto.

## DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA

250 picomoles de proteína intacta, após redução e carboximetilação foram submetidas ao sequenciamento, revelando a porção amino-terminal de ambas as proteínas (BvcTI-1, BvcTI-2, BvcTI-3, BvITI-1, BvITI-2 e BvITI-3) por degradação automática de Edman. Os resultados da Figura 18 para BvcTI-1, BvcTI-2, BvcTI-3, BvITI-1, BvITI-2 e BvITI-3, mostram que BvcTI-1 e BvcTI-2, BvITI-1 e BvITI-2 têm a sequência amino-terminal idênticas até onde foram sequenciadas. Já as formas BvcTI-3 e BvITI-3 se mostram muito parecidas entre si, diferindo apenas em 2 resíduos nos 30 primeiros resíduos sequenciados, mas com mais diferenças comparando com as outras formas.

|         |                                          |
|---------|------------------------------------------|
| BvcTI-1 | EFVTDTDRLLLINGGTYIILPSFRGMGGGL           |
| BvcTI-2 | EFVTDTDRLLLINGGTYIILPSFRGMGGGL           |
| BvcTI-3 | DTLLDTDGEVVRNSGGRYIIIPAFRGNGGGKTLGSTGWES |
| BvITI-1 | EFVTDTDRLLLINGGTYIILPSFRGMNGGGL          |
| BvITI-2 | EFVTDTDRLLLINGGTYIILPSFRGMNGGGL          |
| BvITI-3 | DTLLDQDGEVVRNSGGRYIIIPFWGXNGGG           |

Figura 18. Região amino terminal das isoformas dos inibidores de tripsina de sementes de *Bauhinia variegata* variedade cândida (BvcTI-1, 2 e 3) e de *Bauhinia variegata* variedade lilás (BvITI-1, 2 e 3), determinado por degradação automática de Edman.

A Figura 19 mostra os peptídeos mais representativos provenientes das clivagens de BvcTI-3 com SV8 protease e tripsina, utilizados no alinhamento da sequência.

|      |                                 |
|------|---------------------------------|
| SV5  | GSVKIGASDSKE                    |
| SV7  | AVPPCNGKPSLWTKVE                |
| SV8  | DTYKLMYCPQNSDTCADL.....         |
| SV10 | EGNRRLVVTDDNPLTVRFKKADRS        |
| SV11 | TSDGLPRLIWTTSRILFIPTGFE         |
|      |                                 |
| T3   | LIWTTSR                         |
| T5   | LMYCPQNSDTCADLGISIDEGNR         |
| T7   | KVEGESEGSVK                     |
| T9   | EPFLFRIKSPEDTYK                 |
| T11  | ILFIPTGFELIFFVEAVPPCNGK         |
| T18  | GNGGGKTLSTGWESCPRTVVQANETSDGLPR |

Figura 19. Sequência de aminoácidos dos principais peptídeos obtidos por digestão com SV8 protease (S) e tripsina (T), que contribuíram para determinar a estrutura primária de BvcTI-3.

## ESTUDOS DE SOBREPOSIÇÃO

O sequenciamento da região N-terminal e dos peptídeos permitiram determinar a estrutura primária completa de BvcTI-3, através da análise de sobreposição . A Figura 20 mostra o estudo da sobreposição destes peptídeos. A molécula da proteína possui 167 resíduos de aminoácidos, com um massa molecular calculado de 18529 e a presença de 4 resíduos de ½ cistina.

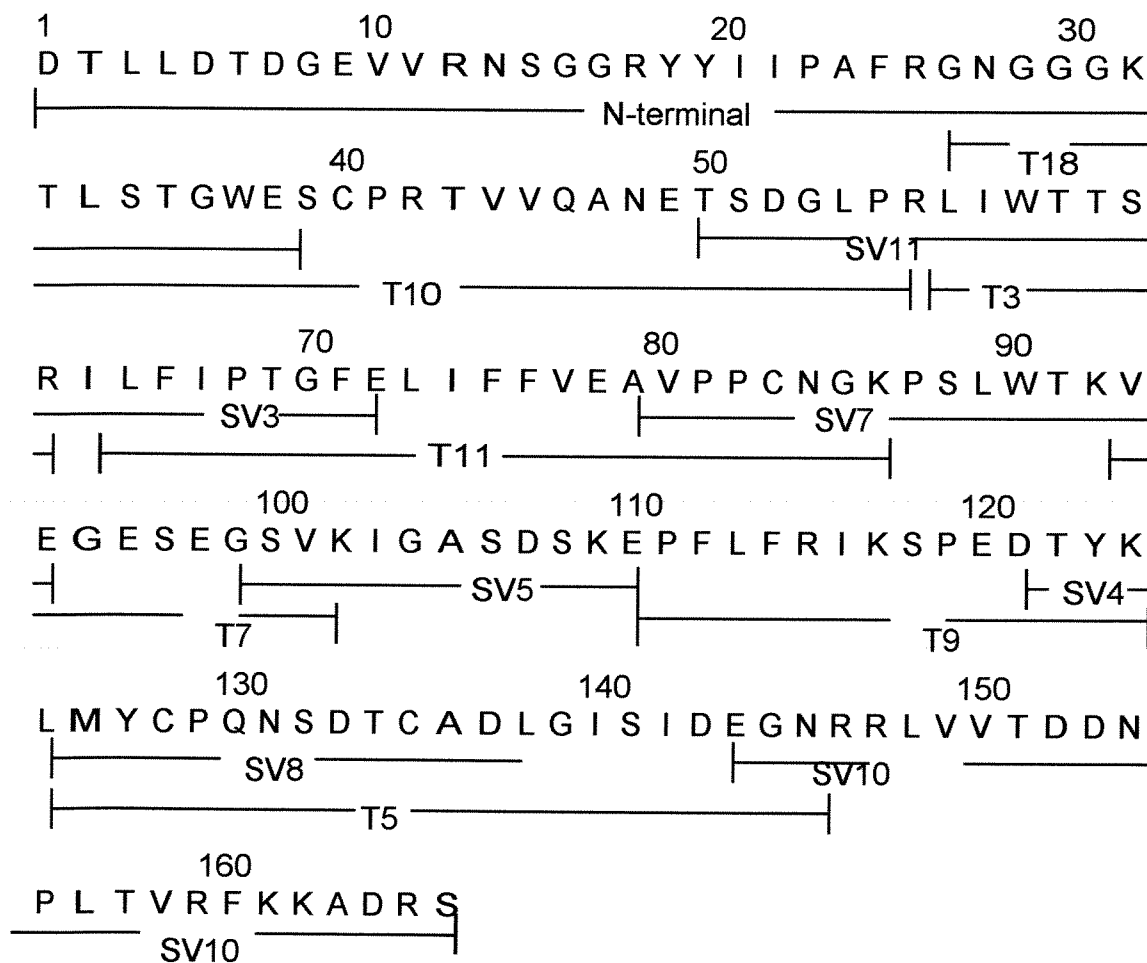


Figura 20. Seqüência completa de aminoácidos da cadeia polipeptídica de BvcTI-3. (--) indica as posições determinadas pela análise de seqüência. Em N é mostrada a região N-terminal, em SV8 são indicados os peptídeos provenientes da clivagem com SV8 protease e T são indicados os peptídeos provenientes da clivagem com Tripsina.

## FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA

Os experimentos preliminares de focalização são mostrados na Figura 21. Nessas condições, o espalhamento das amostras contidas na Figura 21, podem indicar a presença de mais de um inibidor nas preparações de *B. variegata*. Essa suposição é confirmada na Figura 22, que foram usadas as condições otimizadas para a separação dos inibidores. Nessas condições pode se ver que existe um grande número de bandas protéicas (coradas por Coomassie blue) nos precipitados cetônicos, e, após a cromatografia de troca iônica diminui o número de bandas bem coradas. A observação da revelação por atividade inibitória mostra que a inibição de tripsina corresponde à essas três bandas, que focalizam a região de pH aproximadamente de 4,5.

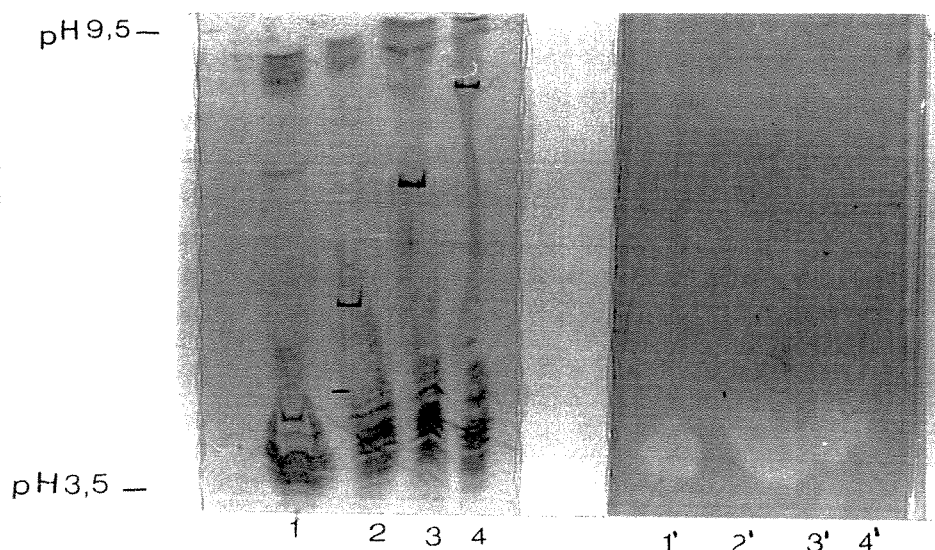


Figura 21. Focalização isoeletrica de precipitado cetônico de extrato bruto de sementes de *B. variegata* var. cândida e var. lilás. 1 e 3 (400 mg / 10 mL); 2 e 4 (800 mg / 20 mL); 1' e 3' (50 mg / 10 mL); 2' e 4' (100 mg / 20 mL) .

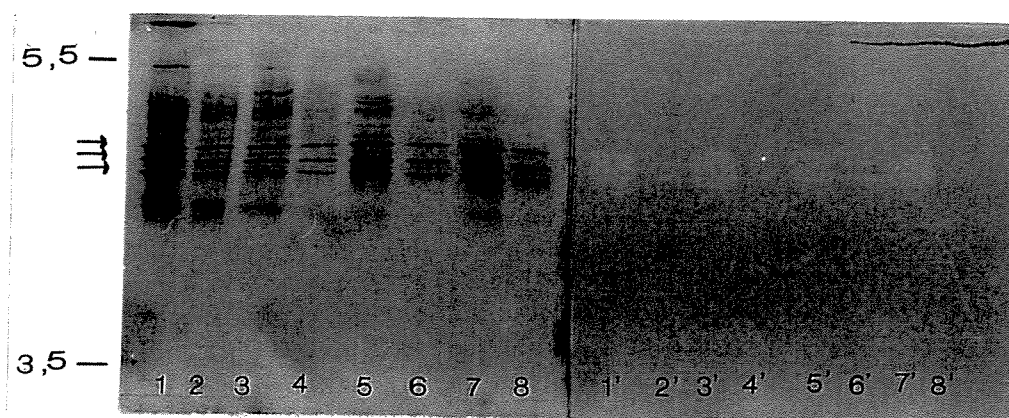


Figura 22. Focalização isoeétrica do precipitado cetônico e do pool da coluna de troca iônica de DEAE- Sephadex A50 dos inibidores de tripsina de *B. variegata* var. cândida e var. lilás. 1 e 2 (400 e 100  $\mu\text{g}$ / 20  $\mu\text{L}$ ) de precipitado cetônico da var. cândida , respectivamente; 3 e 4 (400 e 100  $\mu\text{g}$ / 20  $\mu\text{L}$ ) de precipitado cetônico da var lilás, respectivamente ; 5 e 6 (40 e 10  $\mu\text{g}$ / 20  $\mu\text{L}$ ) do pool da DEAE- Sephadex A50 da var. cândida, respectivamente ; 7 e 8 ( 40 e 10  $\mu\text{g}$ / 20  $\mu\text{L}$ ) do pool da DEAE- Sephadex A50 da var. lilás ,respectivamente; 1' e 2' (50 e 12,5  $\mu\text{g}$ / 20  $\mu\text{L}$ ) de precipitado cetônico da var. cândida, respectivamente; 3' e 4'-(120 e 30  $\mu\text{g}$ / 20  $\mu\text{L}$ ) de precipitado cetônico da var lilás, respectivamente; 5' e 6' (10 e 2,5  $\mu\text{g}$ / 20  $\mu\text{L}$ ) do pool da DEAE- Sephadex A50 da var. cândida ,respectivamente; 7' e 8' (10 e 2,5  $\mu\text{g}$ / 20  $\mu\text{L}$ ) do pool da DEAE- Sephadex A50 da var. lilás, respectivamente.

O ponto isoeétrico de cada isoforma (Figura 23) foi determinado numa focalização isoeétrica em um gel com pH de 3,5 à 5,5. A Figura 23 mostra nitidamente as 3 formas de inibidores de tripsina de *Bauhinia variegata* variedade cândida e as 3 formas de inibidores de tripsina da *B. variegata* variedade lilás, preparação da coluna de troca iônica DEAE-Sephadex A50. O ponto isoeétrico destes inibidores é de 4,85 , 5,00 e 5,15. Esta metodologia discrimina diferenças de  $pI$  em 0,15. A determinação do ponto isoeétrico calculado à partir da sequência de aminoácidos, levando-se em conta os  $pK_a$  de cada aminoácido (Skoog e Wichman, 1986) indica o valor de 4,95 (Figura 24).

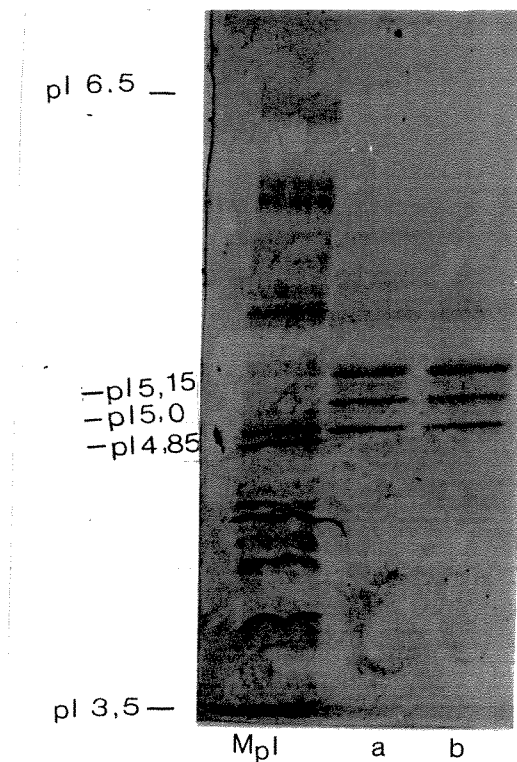


Figura 23. Focalização isoeletrica da fração ativa do "pool" 2 da cromatografia de troca iônica em DEAE- Sephadex A50, onde Mpl é o marcador de ponto isoeletrico: amiloglucosidase (3,5); vermelho de metila (3,75); glucose oxidase (4,15); inibidor de tripsina (4,55);  $\beta$ - lactoglobulina A (5,20); anidrase carbônica B (bovina) (5,85); anidrase carbônica B humana (6,55); a- BvcTI (5 $\mu$ g/mL); b- BvITI (5  $\mu$ g/mL).

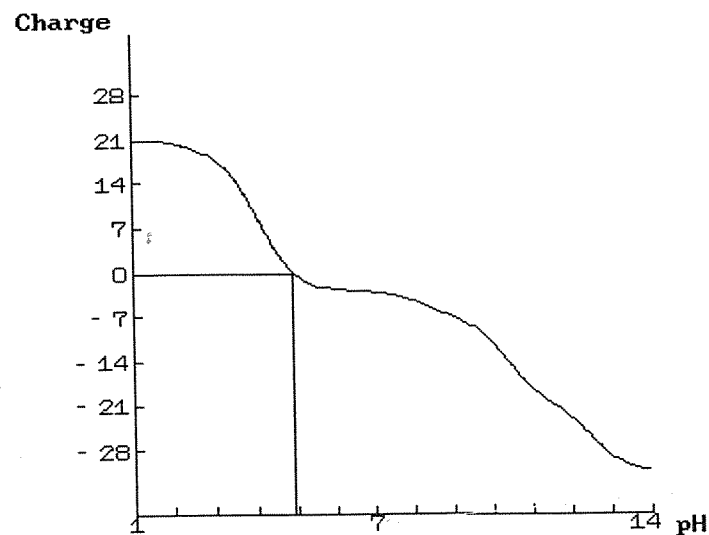


Figura 24. Perfil da curva que relaciona carga-pH da seqüência de aminoácidos do inibidor de tripsina BvcTI-3. O gráfico define a previsão do ponto isoeletrico de BvcTI-3, cujo valor foi calculado como descrito por Skoog e Wichman (1986)

### Focalização isoeletrica dos inibidores de tripsina de sementes de *Bauhinia*

A Figura 25 mostra a região do ponto isoeletrico dos inibidores de tripsina de *Bauhinia variegata* variedade cãndida (1), *Bauhinia variegata* variedade lilás (2), *Bauhinia pentandra* (3), *Bauhinia rufa* (4) e *Bauhinia hallophyla* (5). As amostras de *Bauhinia variegata* variedade cãndida e variedade lilás foram aplicadas em excesso, não sendo possível neste caso, observar as 3 bandas existentes, observadas na Figura 24. A amostra do extrato de sementes de *Bauhinia pentandra* mostrou a existência de 2 inibidores numa faixa de pI entre 6,00 e 6,50. A *Bauhinia rufa* mostra também 2 inibidores com pI aproximadamente 5,00 e 5,15 e um inibidor com pI na faixa de 7,00. A *Bauhinia rufa* mostrou apenas uma banda de inibidor de tripsina com pI de aproximadamente 5,00.

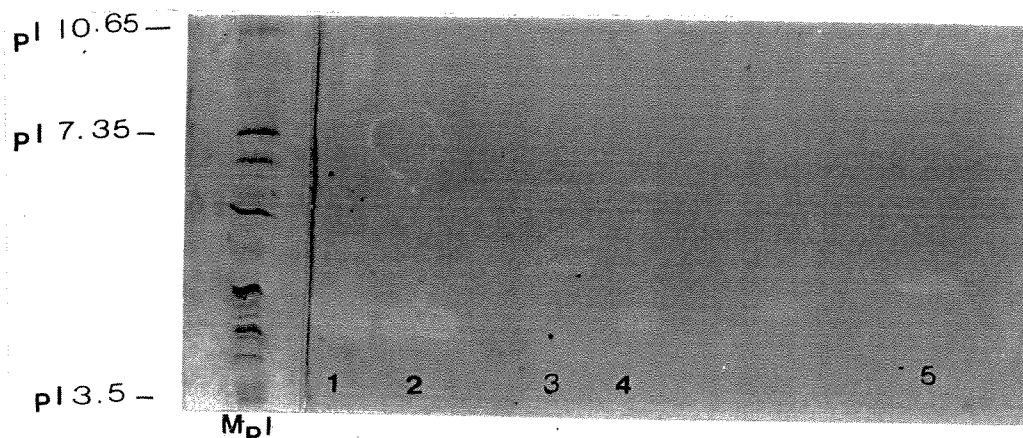


Figura 25. Focalização isoeletrica de extrato bruto de sementes de Bauhinias

Mpi - marcador de ponto isoeletrico (0,2 mg / 20 µL) : - Marcador de ponto isoeletrico (SERVA) Protein Test mixture 3-10 ( Cat.nor. 39211), contendo Citocromo C de cavalo, pI 10,65; Ribonuclease A de pâncreas bovino, pI 9,45; Lectina de *Lens culinaris*, pI 7,75/8,0/8,3; Mioglobina de cavalo, pI 6,9/7,35; Carboanidrase de eritrócitos bovino, pI 6,0; β-lactoglobulina de leite de vaca, pI 5,15/5,3; inibidor de tripsina de soja, pI 4,5; Glucoseoxidase de *Aspergillus niger*, pI 4,2 e Amiloglucosidase de *Aspergillus niger*, pI 3,5. 1- Extrato bruto de sementes de *B. variegata* var. cãndida (0,51 mg/3,05 µL); 2- Extrato bruto de sementes de *B. variegata* var. lilás (1,12 mg/4,5 µL); 3- Extrato bruto de sementes de *B. pentandra* (0,17 mg/µL); 4- Extrato bruto de sementes de *B. rufa* (1,17 mg/7µL); 5- Extrato bruto de sementes de *B. hallophyla* (0,67 mg/4 µL)

## EDEMA

O efeito do BvcTI-3 no aumento da permeabilidade vascular induzido pela caliceína de pâncreas de porco está ilustrado na Tabela 14. O efeito da injeção intradérmica de caliceína de pâncreas de porco (PPK), bradicinina (BK) E Histamina (His) na presença e a ausência de BvcTI-3 em 6 pontos de 3 animais. Podemos observar que o resultado de PPK + PGE1 + BvcTI-3 é quase o dobro do controle.. A Figura 28 ilustra os resultados em forma de gráfico.

| AGENTES                          | EXTRAVASAMENTO DE PLASMA ( $\mu$ L) |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| SALINA ( 100 $\mu$ L)            | 7 $\pm$ 0.7                         |
| PGE1 (0.1 nmol/sítio)            | 14 $\pm$ 2.0                        |
| PPK+PGE1                         | 108 $\pm$ 9.2                       |
| PPK+PGE1+Bv (10 $\mu$ g/sítio)   | 86 $\pm$ 19                         |
| PPK+PGE1+Bv (100 $\mu$ g/sítio)  | 136 $\pm$ 17.1                      |
| PPK+PGE1+Bv (500 $\mu$ g/sítio)  | 202 $\pm$ 18.5*                     |
| BK+PGE1                          | 86 $\pm$ 7.9                        |
| BK+PGE1+Bv (10 $\mu$ g/sítio)    | 56 $\pm$ 3.3                        |
| BK+PGE1+Bv (100 $\mu$ g/sítio)   | 72 $\pm$ 8.6                        |
| BK+PGE1+Bv (500 $\mu$ g/sítio)   | 66 $\pm$ 8.7                        |
| Hist+PGE1                        | 141 $\pm$ 16.5                      |
| Hist+PGE1+Bv (10 $\mu$ g/sítio)  | N.D.                                |
| Hist+PGE1+Bv (100 $\mu$ g/sítio) | 84 $\pm$ 23                         |
| Hist+PGE1+Bv (500 $\mu$ g/sítio) | 159 $\pm$ 15.2                      |
| PGE1 + Bv (500 $\mu$ g/sítio)    | 13 $\pm$ 2.5                        |

Tabela 14. Extravasamento de plasma em edema de pele de coelhos. PPK - caliceína de pâncreas de porco; BK - bradicinina; Hist. - histamina; Bv - inibidor de tripsina de sementes de Bauhinia variegata variedade cândida.

## EDEMA

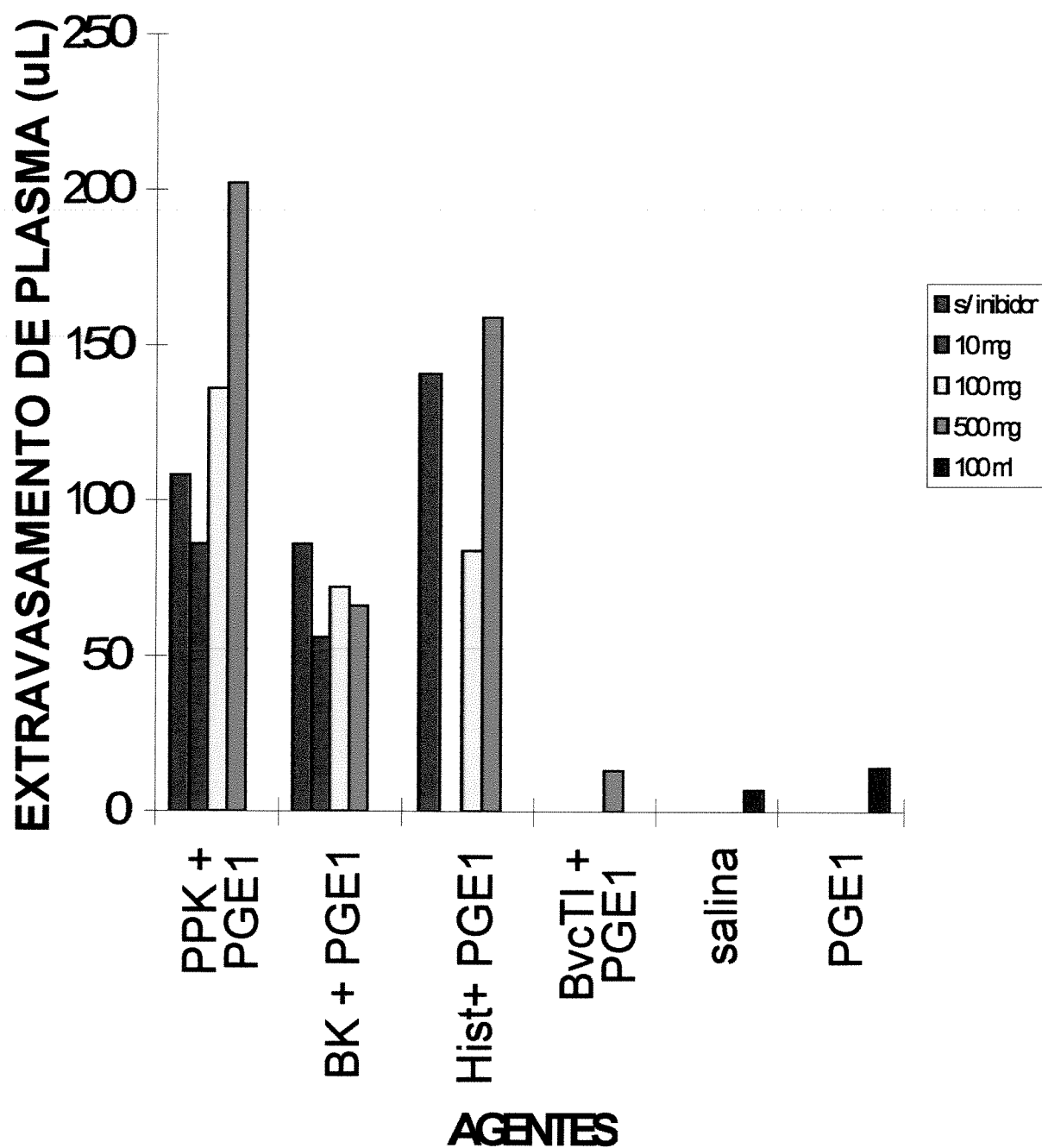


Figura 28. Representação gráfica dos resultados da Tabela 12 de extravasamento de plasma em edema de pele de coelhos. PPK - caliceína de pâncreas de porco; BK - bradicinina; Hist. - histamina; Bv - inibidor de tripsina de sementes de *Bauhinia variegata* variedade cândida.

## 5. DISCUSSÃO

As Leguminosae ou Fabaceae são uma das 3 maiores Famílias das plantas superiores, estimando-se que há de 590 à 690 Gêneros e de 12000 à 17000 espécies (Heywood, 1971).

Este Gênero é especialmente importante no ponto de vista econômico para os seres humanos e animais superiores, pois compreende um grande número de espécies que são fontes de alimentos.

A Família Leguminosae é dividida em 3 principais subfamílias, as Caesalpinoideae, as Mimosoideae e as Papilionoideae. As plantas de Gênero *Bauhinia*, plantas estas que usamos em nosso trabalho, pertencem à sub-família Caesalpinoideae, representada por 570 espécies classificadas botanicamente.

Dentro deste contexto é importante a obtenção de material vegetal, em nosso caso sementes, uniformes e bem classificadas, obtidas de órgãos competentes, como o Instituto Florestal da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, entidade esta responsável pela distribuição de sementes de espécies arbóreas. As sementes de *Bauhinia variegata* variedades cândida e lilás adquiridas no Instituto Florestal para a realização deste trabalho, foram classificadas e o teste de germinação deu resultados de 93 % para a variedade cândida e 95 % para a variedade lilás. Isso significa que as sementes estão em bom estado de conservação e íntegras fisicamente.

Diversas famílias de plantas, dentre elas as Leguminosae, contém em suas sementes e tubérculos concentrações relativamente altas de inibidores de proteinases, particularmente inibidores das enzimas da família da tripsina, as serinoproteinases (Ryan, 1991; Richardson, 1991).

A caracterização de inibidores nas sementes tem um importante papel tanto no ponto de vista nutricional, pois muitas destas sementes são usadas como alimento, como no ponto de vista bioquímico, sendo importantes ferramentas para entender processos biológicos de proteólise.

Diversos métodos são usados para a detecção da presença de inibidores de enzimas em sementes. O método mais conhecido é o ensaio padrão para a enzima em questão com seu substrato, onde é adicionado à solução enzima + substrato a solução com o suposto inibidor, geralmente o extrato bruto de farinha de sementes. Isto é incubado e é observada a inibição máxima da atividade enzimática. Para inibidores de proteinases pode-se monitorar o decréscimo da hidrólise de substratos protéicos (caseína, azocaseína ou haemoglobina) ou sintéticos como o BAPNA ou APANA para tripsina, e BTPNA ou BTEE para quimotripsina, espectrofotometricamente, como foi feito no presente trabalho, ou titulometricamente (Kassel, 1970; Bergmeyer, 1974).

Weder (1981) utiliza método de coloração negativa usando uma diazotação do  $\beta$ - Naftol pela hidrólise do substrato da proteinase Acetil-DL- fenilalanina- $\beta$ -naftil ester (Uriel e Berges, 1968) para a detecção de inibidores de proteinase em gel de poliacrilamida após focalização isoeletrica.

A primeira indicação de que as sementes de *Bauhinia* continham inibidores de tripsina foi dada por Goldstein et al. (1973) e posteriormente por Pinsky e Schwimmer (1974) que isolaram e purificaram um inibidor de tripsina e quimotripsina de *Bauhinia purpurea*.

Os métodos utilizados para a extração e purificação de inibidores são aqueles usados para proteínas vegetais (Richardson, 1991). A extração é feita à partir do material vegetal, em nosso caso sementes, finamente triturado, na maioria das

vezes inteiras, salvo alguns autores, que removem a testa para eliminar pigmentos ou outras substâncias que interferem na purificação subsequente (Richardson, 1991). O extrato das sementes de *Bauhinia variegata* não apresentou qualquer substância que pudesse atrapalhar as análises posteriores (polifenóis, alcalóides, pigmentos), portanto utilizou-se a farinha das sementes inteiras, sem descascá-las, pois estas substâncias, principalmente pigmentos estão em sua grande maioria no tegumento da semente. A extração dos inibidores é feita em solução aquosa, podendo ser salina ou uma solução ácida bem diluída, como por exemplo de ácido sulfúrico, seguindo uma precipitação por sal ou tampões orgânicos (Laskowski, 1955; Jigersons et al., 1960; Jones et al., 1963; Pusztai, 1966; Mansfeld et al., 1960; Ryan e Balls, 1962; Ryan, 1966). O fracionamento de proteínas por acetona pode ser drástico, causando perda na atividade biológica. Este método foi usado por Sallai (1993), que fracionou com acetona o extrato salino de sementes de *Bauhinia forficata*, *Bauhinia rufa* e *Bauhinia unguolata*, não ocasionando a perda da atividade. Com as sementes de *Bauhinia variegata* var. cândida e var. lilás não ocorreu a perda da atividade dos inibidores de tripsina após o fracionamento com acetona, pois a atividade presentes nos extratos salinos das sementes foram preservados (Figuras 3 e 4).

O processo de purificação de várias espécies de Leguminosae, dentre elas *Bauhinia*, descrito por Oliva (1986), consistiu na utilização da cromatografia de afinidade em tripsina-Sepharose, procedimento que resultou numa purificação com rendimento de 56%. O inibidor de cada espécie purificado por este processo apresentava uma banda em PAGE-SDS, indicativo do grau de pureza dessas frações. O uso da cromatografia de afinidade durante o processo de purificação de um inibidor, em geral, apresenta resultados razoáveis quanto ao rendimento da preparação e produção de inibidor, porém se a enzima que estiver ligada à resina, no caso tripsina, não estiver imobilizada em uma forma inativa, existe o risco de uma proteólise no sítio ativo do inibidor, destruindo a sua atividade (Belitz e Weder,

1990). Apesar das vantagens deste método, a hipótese de ocorrer uma proteólise nos inibidores de *Bauhinia variegata* variedade cândida e lilás não pode ser descartada, e baseado nisso, levando-se em conta que um dos objetivos do trabalho é a determinação da estrutura primária de BvcTI-3, não podendo ocorrer proteólise da proteína, o método utilizado para a purificação de BvcTI e BvITI não inclui a coluna de tripsina-Sepharose, para que a estrutura primária esteja o mais íntegra possível.

O processo de purificação dos inibidores BvcTI-3 e BvITI-3, usados neste trabalho, consistiu em um "Batch" em resina de troca iônica DEAE-Sephadex A50 do extrato salino das sementes, após um fracionamento cetônico, seguido por uma cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A50, duas cromatografias de exclusão molecular em Sephadex G75 e Superose 12. Este método de purificação apresentou atividade específica de 0,73 para BvITI e de 0,58 para BvcTI e um rendimento de 8,5 e 4,1 para BvITI e BvcTI, respectivamente. A atividade específica foi aumentando gradativamente conforme as etapas de purificação foram sendo realizadas (Tabelas 6 e 7), estando compatíveis com os dados da literatura (Tanaka, 1991; Oliva, 1986; Lin et al., 1991; Abe et al., 1978, Sallai, 1993).

Os resultados estão coerentes com os resultados de Tanaka (1991), obtidos na purificação do inibidor de tripsina de *Torresia cearensis* e de Lin et al. (1991), para inibidor de tripsina de sementes de *Acacia confusa*.

Os inibidores BvcTI e BvITI perderam a atividade após a cromatografia de fase reversa em HPLC, portanto pela tabela de purificação foi possível controlar a purificação até a etapa anterior à esta. Este fato ocorre com muitos inibidores como para o inibidor de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* EcTI (Batista, 1996) e o inibidor de lentilha LCI-1.7 (Hinkers, 1995) pelo fato dos inibidores tipo Kunitz não serem tão compactos quanto os inibidores tipo Bowman-Birk e desta forma não

mantém a mesma eficiência inibitória após a cromatografia em fase reversa (Tanaka, 1991).

A cromatografia de fase reversa em coluna C18 tem facilitado muito a separação de proteínas. Esta técnica tem sido usada para a separação de vários inibidores de sementes, como por exemplo os inibidores de milho, cevada, Coix, lentilha, *Torresia cearensis*, *Enterolobium contortisiliquum*, soja e outros (Richardson, 1991; Batista et al., 1993; Tanaka, 1993; Hinkers, 1995).

A Tabela 10 mostra que a cromatografia em DEAE- Sephadex A50 foi muito mais eficiente para a purificação do inibidor de tripsina bovina da variedade lilás. No caso do inibidor da variedade cãndida, houve um aumento de atividade específica nesse passo, porém o aumento da atividade específica para o inibidor de quimotripsina foi maior, indicando que talvez fosse possível uma otimização dessa cromatografia. Podemos ver que as quantidades de quimotripsina humana e porcina inibidas são menores que a de tripsina em todas as preparações, exceto para o extrato bruto de sementes da variedade lilás com as enzimas porcina.

A análise da eletroforese (Figura 12) em gel de gradiente PAGE-SDS (10-20%), mostra a progressão da purificação dos inibidores de interesse, através das diferentes etapas (cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A50, cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75, Cromatografia de exclusão molecular em Superose 12).

A fração denominada "pool" 2 obtida na etapa de purificação Superose 12 foi analisada em gel de gradiente PAGE-SDS, onde apresenta somente uma banda de proteína nas duas formas aplicadas no gel, nativa e reduzida (Figura 13 b, c, d, e), demonstrando que há um alto grau de pureza e que a proteína é constituída de uma

única cadeia polipeptídica, com massa molecular aparente por volta de 20000 em relação ao padrão de massa molecular.

A eletroforese em PAGE-SDS não foi capaz de detectar as isoformas, sendo estas detectadas somente em focalização isoelétrica (Figuras 22 e 24), sugerindo que estas isoformas têm a mesma massa molecular diferindo apenas no balanço de cargas elétricas líquidas, isto é, há uma pequena diferença no ponto isoelétrico de cada uma delas na ordem de 0,15, sendo os pontos isoelétricos aparentes de 4,85, 5,0 e 5,15. O resultado se confirmou quando a estrutura primária completa do inibidor BvcTI-3 foi determinada, cujo valor calculado foi de 4,95.

A Figura 23 mostra a focalização isoelétrica de inibidores de tripsina de sementes de 4 espécies de *Bauhínias*. As diferentes espécies diferem entre si nos pontos isoelétricos, sendo que a *Bauhinia variegata variedade cândida*, a *Bauhinia variegata variedade lilás*, a *Bauhinia rufa* e *Bauhinia hallophylla* estão na mesma faixa de pH, porém a *Bauhinia rufa* tem um inibidor de tripsina na faixa de pH de 6.9. As sementes de *Bauhinia pentandra* tem 2 inibidores de tripsina na faixa de pH entre 5.5 e 6.0. Isso sugere que inibidores de proteinase de plantas do mesmo Gênero podem diferir entre si.

O método utilizado para coloração do gel de poliacrilamida após a focalização isoelétrica dos inibidores mostrou que cada variedade de *Bauhinia variegata* estudada tem três isoformas de inibidores de tripsina (Figuras 22 e 2). Este método tem várias vantagens em relação ao método colorimétrico. À partir da focalização isoelétrica, sabemos quantos inibidores estão presentes no extrato bruto da semente e os pontos isoelétricos destes inibidores. Através destas características podemos escolher a melhor metodologia para a purificação, como por exemplo o tipo de resina e o tampão de eluição a serem usados.

As isoformas são caracterizadas por pequenas variações estruturais, e são freqüentemente encontradas tanto em inibidores tipo Bowman-Birk, como tipo Kunitz (Odani e Ikenaka, 1979). Pela determinação da estrutura primária da porção amino terminal das 3 formas de cada variedade de *Bauhinia variegata* vemos que BvcTI-1, BvcTI-2, BvITI-1 e BvITI-2, não diferem entre si nos 30 primeiros resíduos, mas diferem em 50% do N-terminal em relação às formas BvcTI-3 e BvITI-3. O alto grau de homologia nas regiões N-terminal é indicativo que estas 2 últimos são inibidores de tripsina distintos das formas BvcTI-1, BvcTI-2, BvITI-1 e BvITI-2.

Estes resultados indicam que a região amino terminal não contribui para a atividade biológica. Para melhor elucidar este fato serão necessários outros estudos mais detalhados e a determinação da seqüência completa de amino ácidos das proteínas em questão.

A cromatografia de fase reversa confirma a presença das 3 formas de inibidores em ambas as variedades (cândida e lilás), onde o perfil cromatográfico (Figuras 10 e 11) mostram a presença de 3 picos principais.

O estudo cinético para a inibição utilizado no presente trabalho foi baseado no modelo do tipo "slow, tight-binding" proposto por Morrison, e empregados em outros trabalhos (Tanaka, 1991; Lopes, 1992; Sallai, 1993; Batista, 1993). Nesse modelo, "slow" significa que a inibição não é imediata, e "tight-binding" refere-se ao fato de que os inibidores produzem inibição significativa em concentrações próximas às da enzima que está sendo inibida. Os valores de  $K_i$  indicam a magnitude da afinidade entre a enzima e o inibidor. Os inibidores BvcTI e BvITI são capazes de inibir a tripsina, a quimotripsina e a calicreína, porém, nesta metodologia não foi detectado a inibição da quimotripsina por BvcTI e BvITI (Tabela 8).

A ação dos inibidores sobre as enzimas da coagulação, como a calicreína e o fator Xa foram determinadas por diversos autores (Chong e Reeck, 1987; Sampaio et al., 1990; Lopes, 1992; Sallai, 1993). assim, além da tripsina e a quimotripsina, a calicreína e o fator Xa, enzimas estas envolvidas na cascata da coagulação sangüínea, foram ensaiadas com os inibidores BvcTI e BvITI. Não se detectou a inibição do fator Xa (Tabela 8), fato este verificado também com o inibidor de tripsina de *Bauhinia forficata* (Sallai, 1993) e o inibidor TcTI (Oliva, 1988). O inibidor BvITI mostrou-se mais potente para inibir calicreína, em relação ao BvcTI ( $0,69 \times 10^{-8}$  e  $4,5 \times 10^{-8}$ , respectivamente). Estes resultados estão coerentes com os resultados encontrados para outras espécies de *Bauhinias*, os quais estão na ordem de  $2,0 \times 10^{-8}$ ,  $1,5 \times 10^{-8}$  e  $6,9 \times 10^{-8}$  para *B. forficata*, *B. rufa* e *B. unguolata*, respectivamente.

A atividade do inibidor do extrato salino da *Bauhinia variegata* variedade cândida mostrou uma atividade maior contra HT seguida por PT e BT para tripsina e, ao contrário, uma maior atividade contra BCT, seguida do PCT e HCT para tripsina (Tabelas 9 e 10). A preparação do inibidor purificado obtido por cromatografia de troca iônica (I.EX. cândida), também mostrou atividade mais alta contra HT entre as tripsinas e contra BCT entre as quimotripsinas, embora a ordem das outras atividades foi alterada. O enriquecimento na atividade dos inibidores de tripsina nas duas preparações precipitado cetônico e cromatografia de troca iônica, foi por volta de 186 vezes. O baixo enriquecimento para BCT e PCT indicaram a presença de um inibidor específico contra as duas enzimas, o qual foi perdido durante a purificação. Por outro lado, o inibidor de HCT foi enriquecido aproximadamente na mesma proporção que os inibidores de tripsina. Isto indica que os inibidores de quimotripsina perdidos não foram ativos contra HCT.

A Tabela 11, mostra que a purificação no estágio de troca iônica foi melhor para a variedade lilás em ambas as enzimas bovina, porcina e humana, tendo uma

diferença significativa no caso da tripsina porcina, onde purificamos 144,8 vezes a variedade cândida e 480 vezes a variedade lilás.

De uma forma geral, os resultados obtidos com a *Bauhinia variegata* variedade lilás seguiram a mesma tendência. Outra vez, a maior atividade contra tripsina foi encontrada para HT e, BCT para quimotripsina (para ambas as preparações, extrato bruto e inibidor purificado). O enriquecimento maior na atividade contra BT e PT (471 vezes) que para BCT e PCT (93 vezes) indica a presença de inibidores inespecíficos contra as duas quimotripsinas também nesta variedade, o qual também foi perdido na purificação. O enriquecimento contra as duas enzimas humanas foi praticamente o mesmo. Contudo, as razões HCT/BCT e HCT/PCT aumentaram significativamente durante as purificações, embora a razão entre HT/BT e HT/PT decresceu.

Apesar da atividade do extrato bruto da variedade lilás tenha sido menor, e contra algumas enzimas muito menor que aquelas da variedade cândida, as atividades das preparações dos dois inibidores purificados contra a mesma enzima foi praticamente a mesma.

A composição global de aminoácidos dos inibidores de tripsina de sementes de *Bauhinia variegata* variedade cândida e variedade lilás (Tabela 13), apresentaram 167 e 180 resíduos de aminoácidos, massa molecular calculada para os inibidores foi de 18529 e 20018 para BvcTI-3 e BvITI-3 respectivamente. Foram determinadas a presença de 4 cisteínas (amostra não oxidada) sugerindo duas pontes dissulfeto para BvcTI. Essas características sugerem que os inibidores de tripsina BvcTI e BvITI são do tipo Kunitz, resultados estes de acordo com aqueles obtidos para os inibidores de soja (Birk, 1985; Laskowski et al., 1980; Ryan, 1973), *Acacia ssp* (Kortt et al., 1981), *Albizia ssp.* (Odani et al., 1979); *Erytrina cristagalli* e *Erytrina corallodendron* (Joulbert et al., 1985); *Psophocarpus tetragonolobus*

(Yamamoto et al. (1983), que segundo Richardson (1991), esta classe de inibidores de serinoproteases caracterizam-se por possuir uma única cadeia polipeptídica com o massa molecular por volta de 20 KDa, aproximadamente 180 resíduos de aminoácidos, e inclui 1 ou 2 pontes dissulfetos.

Os aminoácidos mais freqüentes são leucina (14 resíduos para BvcTI-3 e BvITI-3), serina (14 e 15 resíduos para BvcTI-3 e BvITI-3, respectivamente), glicina (15 e 16 resíduos para BvcTI-3 e BvITI-3, respectivamente). Podemos constatar um alto conteúdo de ASX e e GLX. O analisador de aminoácidos identifica os resíduos de asparagina e glutamina como ácido glutâmico e ácido aspártico. Os triptofanos não foram determinados., devido ao fato do Triptofano ser um aminoácido suscetível à hidrólise ácida.

O método utilizado detectou 1 resíduo de metionina para ambos os inibidores BvcTI-3 e BvITI-3 e nenhum resíduo de histidina, o que já era esperado, pois as proteínas de origem vegetal, em geral, apresentam concentrações baixas ou nulas desses aminoácido (Ryan, 1981, Kortt e Caldwell, 1990)

A presença de um único tipo de resíduo de aminoácido na posição N-terminal, foi indicativo do grau de pureza das amostras dos inibidores BvcTI-1, 2 e 3 e BvITI-1, 2 e 3. A região amino-terminal mostrou um alto grau de homologia entre os dois inibidores, diferindo apenas em 3 resíduos (posições 6, 22 e 24) de aminoácidos nos 25 primeiros para as formas 3 e sendo totalmente homólogas as formas 1 e 2 entre si, mas diferindo das formas 3 (Fig. 8).

Com a determinação da seqüência de aminoácidos da região N-terminal dos inibidores, baseado no programa de computador FASTA, desenvolvido por Pearson e Lipman (1988) foi possível localizar a família de proteínas à qual eles pertencem,

comparando-os ao banco de dados da EMBL (European Molecular Biology Library) em Heidelberg.

A análise da homologia comparativa da região N-terminal de ambos os inibidores com outras proteínas, mostrou uma alta porcentagem de identidade da sequência de aminoácidos das regiões N-terminal dos inibidores de tripsina de sementes. A Figura 27 mostra a comparação dos resíduos de aminoácidos da região N-terminal dos inibidores BvcTI-3 e BvITI-3 com outros inibidores. Nota-se o alto grau de homologia destes inibidores com outros do tipo Kunitz.

Com o objetivo de obter a sequência completa da estrutura primária do inibidor BvcTI-3, este foi reduzido com DDT (ditiotreitól) e os resíduos de meia-cistina foram carboximetilados com ácido iodoacético. Após redução e carboximetilação, a proteína foi dessalificada, ficando apta a ser submetida à metodologia em química de proteínas para o sequenciamento de sua cadeia polipeptídica.

Visando obter os peptídeos, que nos permitam uma sobreposição dos fragmentos e determinar a ordem dos aminoácidos na estrutura primária, o inibidor BvcTI-3 foi submetido à clivagem enzimática com protease SV8 de *Staphylococcus aureus* e com tripsina.

Protease SV8 é uma endopeptidase, que hidrolisa a cadeia polipeptídica nas ligações de Glu nas condições de tampão bicarbonato de amônio 50 mM, pH

7,8 e cliva aminoácidos Asp e Glu em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,8 (Houmard e Drapeau, 1972).

O inibidor BvcTI-3 foi submetido às condições de clivagem em Asp e Glu por 18 horas a 37 °C.

A sequência de aminoácidos completa de BvcTI-3 foi determinada e consiste em 167 resíduos. Os dados de sequência estão compatíveis com a composição de aminoácidos mostrada na Tabela 13. A sequência de aminoácidos deste inibidor é consideravelmente homóloga à outros inibidores de tripsina. A Figura 29 mostra a homologia de BvcTI-3 com ACTI, STI e inibidor de tripsina de sementes de *Psophocarpus tetragonolobus*, todos da família Kunitz.

Figura 27. Homologia das seqüência de aminoácidos dos inibidores de tripsina BvcTI-3 (*Bauhinia variegata* variedade cândida, ACTI (*Acacia confusa*), SBTI (*Glycine max*) e PtTI (*Psophocarpus tetragonolobus*).

O sítio ativo do inibidor BvcTI-3 não foi determinado experimentalmente, pois os resíduos 63 e 64, onde se localizam o sítio ativo dos inibidores de tripsina tipo Kunitz, são os mesmos para outros inibidores, os quais já foram determinados experimentalmente. A Figura 28 mostra a região do "loop" contendo o sítio reativo de inibidores tipo Kunitz (EcTI, LITI, BvTI, BuXI, e SbTI), definido pelos resíduos Cys 40 e Cys 83 (numeração de BvcTI-3).

|         | 40        | 50         | 60        | 70        | 80              |
|---------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------------|
| BvcTI-3 | CPRTVVQAN | ETSDGLPRLI | WTTSRILFI | PTG FEL   | IFFVEAV PPC     |
| EcTI    | CPLNVVQAR | GETKRGRPA  | IIWTPPRIA | ILTPAFYLN | IEFQTKDLPAC     |
| LITI    | CPRTVVQTR | SETSRGLPAR | LASPYRIL  | ILGSNIPLT | IEFQPQKPYS      |
| BvTI    | CPRTVVQAS | SEHSDGLPV  | VVISALPR  | SLSFISTSQ | RVTIQ FVEA PTC  |
| BuXI    | CPHTVVQAS | SEISNGLPV  | MIAALPR   | TMFISTAW  | RYS IQFLK V PTC |
| SbTI    | CPLTVVQSR | NELDIGIGT  | IISSPFRI  | RIRFIAEG  | NPLRLKFD        |
|         |           |            |           |           | SVAVIMLC        |

Figura 28. Homologia do sítio reativo dos inibidores de tripsina tipo Kunitz. Sequência dos inibidores de proteinase no "loop" formado pelas pontes de dissulfeto entre Cys-40 e Cys-83 (numeração de BvcTI-3). EcTI, inibidor de tripsina de *Enterolobium contortisiliquum*; LITI inibidor de tripsina de *Leucaena leucocephala*; BvTI, inibidor de tripsina de *Bauhinia variegata* variedade roxa; SbTI, inibidor de tripsina de soja (Sampaio et al., 1996).

Os experimentos de edema através do extravasamento de plasma em pele de coelhos apresentaram um resultado inesperado, pois estes resultados indicam que os inibidores de tripsina BvcTI-3 e está potenciando o efeito da calicreína tissular já que houve o aumento do extravasamento celular. A Tabela 14 mostra que quando a calicreína é usada sozinha com o PGE1 ela induz à um extravasamento de plasma de  $108 \pm 9,2 \mu\text{L}$ , e quando a calicreína é aplicada com o inibidor BvcTI-3 o extravasamento é o dobro do primeiro ( $202 \pm 18,5$ ). A explicação desse achado pode estar relacionado com o processamento de calicreína pancreática após injeção em animais. Como esta enzima não é inibida diretamente por BvcTI o inibidor pode estar interferindo com alguma protease tissular ou plasmática que inativa a PK no nosso modelo, aumentando a vida média da enzima.

## 6. RESUMO

A presença de inibidores de serinoproteinases foi investigada em sementes de duas variedades de *Bauhinia variegata* (Leguminosae, Caesalpinoideae).

A purificação dos inibidores de *Bauhinia variegata* variedade cãndida e variedade lilás por cromatografia de troca iônica, cromatografias de exclusão molecular e subsequente cromatografia de fase reversa, evidenciaram nestas espécies 3 isoformas (BvcTI-1, 2 e 3; e BvITI-1, 2 e 3) de inibidores de proteinase com cadeia polipeptídica única.

A análise global de aminoácidos resultou em 167 e 180 resíduos de aminoácidos para BvcTI-3 e BvITI-3, respectivamente, e em massa molecular calculada de 18529 para BvcTI-3 e de 20018 para BvITI-3, e 4 resíduos de cisteína para BvcTI-3 e 2 resíduos de cisteína para BvITI-3. Estes resultados incluem estes inibidores na Família de inibidores tipo Kunitz.

A coloração para inibidores de tripsina após focalização isoeletrica demonstrou a presença de inibidores com pontos isoeletricos aparentes de 4,85, 5,00 e 5,15.

A determinação da estrutura primária completa de BvcTI-3 e da estrutura primária do N-terminal das isoformas de BvcTI e BvITI, confirmam alta homologia com inibidores tipo Kunitz.

Os inibidores BvcTI e BvITI atuam seletivamente sobre serinoproteinases. Extratos de sementes e inibidores purificados de *Bauhinia variegata* var. cãndida e var. lilás foram testados para atividade de inibição contra tripsina e quimotripsina bovina, porcina e humana, sendo que estas enzimas foram fortemente inibidas pelos inibidores em estudo.

O teste de edema através do extravasamento de plasma em pele de coelhos, mostrou que BvcTI potenciou a calicreína de pâncreas de porco.

## 7. SUMMARY

The presence of serine proteinase inhibitors was investigated in the seeds of *Bauhinia* variety *cândida* and *Bauhinia variegata* variety *lilás* (Leguminosae, Caesalpinoideae).

The purification of inhibitors from the *Bauhinias* by ion-exchange chromatography, molecular exclusion chromatography and subsequent reverse phase chromatography, showed the presence of three isoforms (BvcTI-1, 2 and 3 ; BvITI-1, 2 and 3) in the two species studied with single polypeptide chain.

The aminoacid analysis of the forms BvcTI-3 and BvITI-3 resulted in 167 and 180 aminoacids residues, respectively, and the calculated molecular masses were 18529 to BvcTI-3 and 20018 to BvITI-3. It showed 4 cysteine residues to BvcTI-3 and 2 cysteine residues to BvITI-3, and no free thiol groups. This results suggest that these proteins belongs to the Kunitz-type plant inhibitors family.

Staining for trypsin inhibitors after isoelectric focusing showed the presence of inhibitors with isoelectric point about 4.85, 5.00 and 5.15.

The primary structure sequence of BvcTI-3 was determined, confirming the inhibitor as Kunitz type,

The inhibitors BvcTI and BvITI act selectively on serine proteinases. Extracts from seeds and purified inhibitors of both *Bauhinia variegata* variety *candida* and *Bauhinia variegata* variety *lilas* were tested for inhibitory activity against trypsin and chymotrypsin, from cattle, pig and humans. This three enzymes were strongly inhibited by both inhibitors.

The oedema test in rabbits showed the BvcTI made the kallikrein of porcine pancreas more potent to plasma. extravasation.

## 8.BIBLIOGRAFIA

Abe, O.; Ohata, J.; Utsumi, Y. e Kuromizu, K. (1978). Proteinase inhibitor from *Vicia angustifolia* L. var. *segetalis* Koch. Isolation, characterization and chemical modification. J. Biochem. 83:1749-56.

Abe, O.; Shimokawa, Y. e Araki, T. (1978). Trypsin reactive site of the *Vicia angustifolia* proteinase inhibitor. J. Biochem,83: 1737-48.

Almeida, T. V. (1989). Hemostaticos e anticoagulantes. In: Farmacologia Aplicad (Zanini, C. A. e Oga, S.) Atheneu ed. São Paulo, 4ªed.

Asao, T.; Imai, F.; Tsuji, I.; Tashiro, M.; Iwami, K. e Ibuki, F. (1991). The aminoacid sequence of a Bowman-Birk type proteinase inhibitor from Faba beans (*Vicia faba* L.). J. Biochem., 110:951-955.

Barr, P. J. (1991). Mammalian subtilisins: The long-sought dibasic processing endoproteases. Cell, 66: 1-3.

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

Barton, G.J. e Stenberg, J.E. (1987). A strategy for the rapidly multiply alignment of protein sequences. Confidences level for tertiary structure comparisons. J. Mol. Biol., 198: 327-37.

Batista, I. F. C.; Oliva, M. L. V.; Araujo, M.; Sampaio, M. U.; Richardson, M.; Fritz, H. e Sampaio, C.A.M. (1996). Primary Structure of a Kunitz-type trypsin Inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. Phytochemistry., 4: 1017-22.

Belitz, H.-D. e Weder, J.K.P. (1990). Protein inhibitors of hydrolases in plant foodstuffs. Food Rev. Int., 6, 151-211.

Beltrati, C. M. e Paoli, a. A. (1989). Morfologia, anatomia e desenvolvimento das sementes e plântulas de *Bauhinia forficata* Link. (Leguminosae-Caesalpinoideae). Rev. Bras. Biol. 49: 583-590.

Bergmeyer, H. V. (1974). Methods of Enzymatic Analysis (H.V. Bergmeyer, ed.) Vol. 2, p. 1018- 1021. Academic Press, New York.

- Birk, Y. e Applebaum, Y. (1985). The Bowman-Birk inhibitor: trypsin and chymotrypsin inhibitor from soybeans. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 25: 113-131.
- Birk, Y.; Gertler, A. e Khalefs, S. (1963). Further evidence for a dual, independent, activity against trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin of inhibitor AA from soybeans. *Biochim. Biophys. Acta.* 147: 402-4.
- Birk, Y.(1976). Proteinase Inhibitors from Plant Sources. *Meth. Enzymol.*, 19: 695-751.
- Birk, Y. (1985).The Bowman-Birk Inhibitor. *Int. J. Peptide Prot Res.* 25: 113-31.
- Birk, Y. e Goldstein, Z. (1973).Multifunctional proteinase inhibitor from *Bauhinia* seeds. *Nature New Biology*, 246: 29-30.
- Bishop, P. D.; Pearce, G.; Bryant, J. E. e Ryan, C. A. (1984). Isolation and characterization of the proteinase inhibitor- inducing factor from tomato leaves. *J. Biol. Chem.* 259: 13172-13177.
- Blakesley, r. W. e Boezi, J. A. (1977). A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant blue. *Anal. Biochem.* 82: 580-582.
- Blanco-Labra, A. e Iturbe-Chinas, F. A. (1981). Purification and Characterization of an alfa-amylase from Mays (*Zea mays* L.). *J. Food Biochem.*, 5: 1-17.
- Bhoola, K.D.; Figueroa, C.D. e Worthy, K. (1992). Bioregulation of kinin: kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacol. Rev.* 44: 4-80.
- Borchers, R. e Ackerson, C. W. (1947). Trypsin inhibitor. IV. Occurrence in seeds of the Leguminosae and other seeds. *Arch. Biochem. Biophys.*, 13: 291-293.
- Boulter, D. (1983). Flowering plant proteins. In: *Phytochemistry*. vol. 2 . Miller, L. P. Editor. Van Nostrand Reinhold Company.
- Bowles, J. D. (1990). Defense-related proteins in higher plants. *Ann. Rev. Biochem.* 59 : 873-5.
- Brown, W.E.; Takio, K.; Titani, K. e Ryan, C. (1985). Wounded- induced trypsin inhibitor in Alfalfa leaves. Identity as a member of the Bowman-Birk inhibitor family. *Biochemistry.* 24: 2105-2108.

- Brzin, J.; Popovic, T.; Drobnic- Kosorok, M.; Kotinik, M. e Turk, V. (1988). Inhibitors of cysteine proteinase from potato. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. 369: 633-38.
- Campbell, R. (1985). *Plant Microbiology*. Edward Arriolo (Publishers) Ltd. London.
- Carrell, R. W.; Jeppsson, J. O.; Laurell, C-B.; Brennan, O.S.; Owen, M.C. Vaughan, L. e Boswell, D. R. (1982). Structure and variation of human  $\alpha$ 1-antitrypsin. *Nature*, 298:329.
- Cesar, O. (1988). Composição florística, fitossociológica e ciclagem de nutrientes em mata mesófila semidecídua (Fazenda Barreiro Rico, Mun. Anhembi, S.P.). Tese de Livre Docência. Instituto de Biociências. Universidade Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, S.P. 233p.
- Chase, T. e Shaw, E. (1970). Tritation of trypsin, plasmin and thrombin with p- nitro-phenyl- p- guanidinobenzoate HCl. *Meth. Enzym.* 19: 20-27.
- Chessin, M. e Zipf, A. E. (1990). Alarm Systems in Higher Plants. *The Botanical Review*.56.
- Chong, G. L. e Reeck, G. R. (1987). Interaction of trypsin,  $\beta$ - factor XIIa, and plasma kallikrein with a trypsin inhibitor isolated from barley seeds: a comparison with the corn inhibitor of activated Hagman factor. *Thromb. Res.*, 48: 211-21.
- Chrispeels, M.J. e Raikhel, N. V. (1991). Lectins, Lectins genes, and their Role in Plant Defense. *The Plant Cell* 3:1-9.
- Churella, H.R.; Yao, B. C. e Thomson, W. A. B. (1976). Soybean trypsin activity of soy infant formulas and its nutritional significance for the rat. *J. Agric. Fd. Chem.* 24: 393-396.
- Cornelissen, B. J. C.; Hooft, Van-Huijsduijnen, R. A. M. e Bol, J. F. (1986). A tobacco mosaic virus-induced tobacco protein is homologous to the sweet-tasting protein thaumatin. *Nature*, 321: 531-532.
- Corner, E. J. H. (1976). *The seeds of dicotyledons*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Correa, P. (1981). Epidemiological correlation between diet and cancer frequency. *Cancer Res.*, 41:3685-90.

- Cruz, G. L. (1982). *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil*. Editora Civilização Brasileira S.A. Rio de Janeiro.
- Dickerson, R. G. e Geis, I. (1969). *The structure and action of proteins*. Harper e Row, Publishers. New York. p. 67-69.
- Dixon, R. A. e Lamb, C. J. (1990). Molecular Communication in interactions between Plants and Microbial Pathogens. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 41: 339-67.
- Domoney, C.; Welham, T. e Sidebottom, C. (1993). Purification and characterization of *Pisum* seed Trypsin Inhibitors. *J. Exp. Bot.* 44: 701-709.
- Edens, L.; Heslinga, L.; Klok, R.; Ledebøer, A.M.; Maat, J.; Toonem, Y.; Visser, C. e Verrips, C.T. (1982). Cloning of cDNA encoding the sweet-tasting plant protein thaumatin and its expression in *Escherichia coli*. *Gene*, 188: 1-12.
- Edman, P. e Begg, G. (1967). A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* 1: 80-81.
- Enzyme Nomenclature: (1992). Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and Classification of Enzyme. San Diego: Academic Press, p.31.
- Erlanger, B.F.; Kokowsky, N. e Cohen, E. (1961). Preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 95: 271-78.
- Fagan, J. M. e Waxman, L. (1991). Identification of a soluble enzyme from C3H/10T1/2 cells which is inhibited by Bowman-Birk proteinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 178: 856-61.
- Farsnsworth, N. R. (1973). Importance of secondary plant constituents as drugs. In: *Phytochemistry*, Vol. 3. Miller, L. P. Editor, Van Nostrand Reinhold Company.
- Fiedler, F. (1979). Enzymology of glandular kallikreins. In: Bradykinin, kallidin and kallikrein, ed. by E.G. Erdos, p- 103-161, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Fritz, H.; Fiedler, F.; Dietl, T.; Warwas, M.; Trusceit, E.; Kolb, H.J.; Mair, G. e Tschesche, H. (1977). On the relationships between pancreatic, submandibular and urinary kallikreins. In: Kininogenases: kallikreins. ed. by G. L. Haberland, J.W. Rohen and T. Suzuki, p. 15-28, Schattauer, Stuttgart, New York.

- Frokiaer, H.; Horlyck, L. e Sorensen, S. (1994). Immunoaffinity Chromatography Purification and Characterization of Pea Trypsin Inhibitors. *J. Sci. Food. Agric.* 66: 61-69.
- Gatehouse, A.M.R.; Minney, B.H.; Dobie, P. e Hilder, V. (1990). Biochemical resistance to Bruchide attack in legume seeds; Investigation and exploitation. In: Bruchides and Legumes : Economics, ecology and convolution, 241-256.
- Gatehouse, A. M. R.; Howe, D. S.; Flemming, I. E.; Hilder, V. A. e Gatehouse, J. A. (1991). Biochemical basis of insect resistance in winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) seeds. *J. Sci. Food Agric.*, 55: 63-74.
- Godbole, S. A.; Krishna, T. G. e Bhatia, C. R. (1994). Changes in Protease Inhibitory Activity from Pigeon Pea (*Cajanus cajan* (L) Millsp) During Seed Development and Germination. *J. Sci. Food. Agric.* 66: 497-501.
- Goldstein, Z.; Trop, M. e Birk, Y. (1973). Multifunctional proteinase inhibitors from Bauhinia seeds. *Nature New Biol.*, 246: 29-31.
- Green, T.R. e Ryan, C.A. (1972). Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves : a possible mechanism against defense insects. *Science*, 175: 776-777.
- Gregory, P.; Tingey, W.M.; Ave, D. A. e Bouthyette, P. Y. (1986). Potato glandular Trichomes : A physicochemical defense mechanism against insects. *Am. Chem. Soc.*
- Hamato, N.; Takano, R.; Kamei-Hayashi, K. e Hara, S. (1992). Purification and characterization of serine proteinase inhibitors from gourd (*Lagenaria leucantha* Rusby var. gourda Makino) seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56 : 275-279.
- Hara, S.; Marino, J. e Ikenaka, T. (1989). Aminoacids sequences and disulfide bridges of serine proteinase inhibitors from bitter gourd (*Momordica charantia* L.) seeds. *J. Biochem.* 105:88-92.
- Hartley, B. S. (1960). Proteolytic Enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 229: 45-72.
- Hartley, B. S.; Brown, J. R.; Kauffmann, D. L. e Smillie, L. B. (1965). Evolutionary Similarities between pancreatic proteolytic enzymes. *Nature*, 207:1157-59.
- Hartl, P. M.; Tan-Wilson, A. L. e Wilson, K. A. (1986). Proteolysis of Kunitz soybean trypsin inhibitor during germination. *Phytochemistry*. 25: 23-26.

Hass, G. M.; Nau, H.; Biemann, K.; Grahan, D. T.; Ericson, L. H. e Neurath, H. (1975). The amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes. *Biochemistry*, vol. 14: 1334-42.

Heinrikson, R. L.; e Meridith, S C. (1984). Amino acid analysis by reverse phase high- performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylthiocyanate. *Anal. Bioche.*, 136: 65-72.

Hejgaard, J.; Dam, J.; Petersen, L. C. e Bjorn, S. E. (1994). Primary structure and specificity of the major serine proteinase inhibitor of amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) seeds. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1204: 68-74.

Heneine, I.F. (1987). *Biofísica Básica. Soluções*. Livraria Atheneu - Série Biomédica, Rio de Janeiro, 1ª edição.

Heywood, V.H. (1971). The Leguminosae. A systematic Purview. In: Harborne, J.B.; Boulter, D. e Turner, B.L. Chemotaxonomy of the Leguminosae. Academic Press. London and New York, p 1-30.

Hilder, V. A.; Gatehouse, A. M. R.; Sheerman, S. E.; Barker, R. F. e Boulter, D. (1987) A novel mechanisms of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* (330): 160-63.

Hinkers, S. (1995). Proteinaseinhibitoren aus Speiselinsen (*Lens culinaris* Medik.) - Primärstruktur des trypsin-chymotrypsin - Inhibitors LCI-1.7. Tese de Doutorado apresentada à Fakultät für Chemie, Biologie und Geowissenschaften da Technischen Universität München, Munique, Alemanha.

Hojima, Y.; Moriya, H. e Moriwaki, C. (1971). Studies of kallikrein inhibitors in potatoes. I Partial purification and some properties. *J. Biochem.*, 69 : 1019-1025.

Hojima, Y.; Moriya, H. e Moriwaki, C. (1971). Studies of kallikrein inhibitors in potatoes. II Effect of potato kallikrein inhibitors on various kallikreins and other proteases. *J. Biochem.*, 69: 1027- 1032.

Hojima, Y.; Moriwaki, C. e Moriya, H. (1973a). Studies on kallikrein inhibitors from potatoes. IV Isolation of two inhibitors and determination of molecular weights and aminoacid compositions. *J. Biochem.*, 73 : 923- 932.

Hojima, Y.; Moriwaki, C. e Moriya, H. (1973b). Studies on kallikrein inhibitors from potatoes. V Characterization of two isolated inhibitors. *J. Biochem.*, 73 : 933-43.

Hojima, Y. ; Pierce, J.V. e Pisano, J.J. (1980). Hageman factor fragment inhibitor in corn seeds: purification and characterization. *Thrombosis Research*. 20: 149-62.

Holm, H. e Krogdahl, A. (1982). Problems in Predicting the Inhibition of Human Pancreas Proteinases by Soya Bean Proteinase Inhibitors: In-Vitro Assays Employing Human, Bovine and Porcine Proteinases. *J. Sci. Food. Agric.* 33: 1164-1171.

Houmard, J. e Drapeau, G.R. (1972). Staphylococcal protease: A proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 69: 3506-3509.

Hutchinson, J.L. (1964). The genera of flowering plants (*Angiospermae*). Oxford, University Press. V.1, 516P.

Hwang, D. L-R.; Lin, K-T. D.; Yang, W-K. e Foard, D. E. (1977). Purification, Partial characterization, and immunological relationships of multiple low molecular weight protease inhibitors of soybean. *Biochim. Biophys. Acta*, 495:369.

Jackson, C.M. e Nemerson, Y. (1980). Blood coagulation. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 765-811.

Janzen, D. H. (1979). New horizons in the biology of plant defenses. In: Herbivores. Academic Press Inc.

Janzen, D.H. (1981). The defenses of legumes against herbivores. *Adv. Leg. Syst.*

Janzen, D.H. (1981). Lectins and Plant-Herbivore Interactions. In: Recent Adv. Phytochem. 15:241-158.

Jansen, D.H.; Ryan, C.A.; Liener, I.E. e Pearce, G. (1986). Potentially defensive proteins in mature seeds of 59 species of tropical Leguminosae. *J. Chem. Ecol.* 12: 1469-80.

Jirgensons, B.; Ikenaka, T. e Gorguraki, V. (1960). A study of trypsin inhibitors. *Makromol. Chem.*, 39: 149-165.

Jofuku, K. e Goldberg, R.B. (1989). Kunitz trypsin inhibitor genes are differentially expressed during the soybean life cycle and in transformed tobacco plants. *The Plant Cell* (1) : 1079-93.

- Jones, G.; Moore, S. e Stein, W.H. (1963). Properties of chromatographically purified trypsin inhibitors from lima beans. *Biochemistry*, 2: 66-71.
- Joubert, F. J. e Sharon, N. (1985). Proteinase inhibitors from *Erythrina corallodendron* and *Erythrina cristagalli* seeds. *Phytochemistry*. 24: 1169-1179.
- Kakade, M. L.; Simons, N. R.; Liener, I. E. e Lambert, J. W. (1972). Biochemical and Nutritional Assessment of Different Varieties of Soybean. *J. Agr. Fd. Chem.* 20: 87-90.
- Kassel, B. (1970). Naturally Occurring Inhibitors of Proteolytic Enzymes. *Meth. Enzymol.*, 19: 839-932.
- Kennedy, A. R.; Radner, B. S e Nagasawa, H. (1984). Protease inhibitors reduce the frequency of spontaneous chromosome abnormalities in cells from patients with Bloom Syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81: 1827-1830.
- Kirsi, M. e Mikola, J. (1971). Occurrence of Proteolytic Inhibitors in various tissues of barley. *Planta*, 96:281-91.
- Knight, D. G. (1986). the characterization of enzymes inhibitors. In: Barret, A. J. e Salvesen, N. G., ed. Proteinase Inhibitors. Amsterdam, Elsevier, p. 23-51.
- Kogan, M. (1986). Natural chemicals in plant resistance to insects. *Iowa State Journal of Research*, 60: 501-27.
- Koide, T. e Ikenaka, T. (1973a). Studies on soybean trypsin inhibitors.1 Fragmentation of soybean trypsin inhibitor (Kunitz) by limited proteolysis and by chemical cleavage. *Eur. J. Biochem.*, 32: 401-7.
- Koide, T. e Ikenaka, T. (1973b). Studies on soybean trypsin inhibitors.3 Aminoacid sequences of the carboxyl-terminal region and the complete the aminoacid sequence of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). *Eur. J. Biochem.*, 32: 417-31.
- Koide, T.; Tsunasawa, S. e Ikenaka, T. (1973c). Studies on soybean trypsin inhibitors.2 Aminoacid sequence around the reactive site of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). *Eur. J. Biochem.* 32: 408-16.
- Kortt, A. A. e Jermyn, M. A. (1981). Acacia proteinase inhibitors purification and properties of the trypsin inhibitors from *Acacia elata* seed. *Eur. J. Biochem.*, 115: 551-57.

- Kortt, A. A. e Caldwell, J. B. (1990). Low molecular weight albumins from sunflower seed: identification of a methionine rich albumin. *Phytochemistry*. 9: 2805-2810.
- Krishnamoorthi, R.; Gong, Y.; Lin, C-L.S. e Vandevelde, D. (1992). Two-dimensional NMR studies of squash family inhibitors. Sequence-specific proton assignments and secondary structure of reactive-site hydrolyzed *Cucurbita maxima* trypsin inhibitors III. *Biochemistry*, 31: 898-904.
- Krishnamoorthi, R.; Lin, C-L.S.; Gong, Y.; Vander Velde, D. e Hahn, K. (1992). Proton NMR studies of *Cucurbita maxima* trypsin inhibitors: Evidence for pH dependent conformational change and Hys26-tyr27 interaction. *Biochemistry* 31: 905- 910.
- Krogdahl, A. e Holm, H. (1983). Pancreatic proteinase from man, trout, rat, pig, cow, chicken, mink and fox. Enzyme activities and inhibition by soybean and lima bean proteinase inhibitors Comp. Biochem. Physiol. 74B: 403-409.
- Kuhlmann, M. e Kuhn, E. (1947). A flora do distrito de Ibiti. Publ. Inst. Bot. Secret.Agric. São Paulo.
- Kunitz, M. (1945). Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. *Science*, 1011: 668-669.
- Kunitz, M. (1946). Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.*, 29: 149-154.
- Laskowski, M. (1955). Naturally occurring trypsin inhibitors. *Meth. Enzymol.*, 2, 36-54.
- Laskowski, M. e Kato, I. (1980). Protein inhibitor proteinase. *Ann. Rev. Biochem.*, 49: 593-626.
- Laskowski, M. e Sealock, R.W. (1971). Protein proteinase inhibitors- Molecular Aspects. IN: Boyer, P. D. The Enzymes. New York, Academic Press, 3: 17-22.
- Lenarcic, B.; Ritonja, A.; Turk, B.; Dolenk, I. e Turk, U. (1992). Characterization and structure of pineapple stem inhibitor of cysteine. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 373: 459-464.

- Liener, I. E. e Kakade, M. L. (1980). Proteinase inhibitors. In: Toxic Constituents of Plant Foodstuff (Edited by Liener I.E.), pp. 7-77. Academic Press, New York.
- Lindberg, I. (1991). The new eucariotic precursor processing proteinase. *Mol. Endocrinol.*, 5: 1371-1375.
- Lin, J.Y.; Chu, S-C.; Wu, H-C. e Hsieh, Y.S. (1991). Trypsin inhibitor from seeds of *Acacia confusa*. *J. Biochem.*, 110: 879-83.
- Lipke, H.; Fraenkel, G.S. e Liener, I. (1954). Effect of soybean inhibitors on growth of *Tribolium confusum*. *J. Agric. Food Chem.*, 2:410-414.
- Lopes, A.P.Y. (1992). Estudo comparativo da inibição de caliceína plasmática humana e fator Xa por inibidores proteicos. Tese de mestrado- Escola Paulista de Medicina, São Paulo, S.P.
- Lotant, T. e Fluhr, R. (1990). Function and regulated accumulation of plant Pathogenesis-Related Proteins. Review Article. *Symbiosis*, 8:33-46.
- Lyons, A.; Richardson, M.; Tatham, A. S. e Shewry, P. R. (1987). Characterization of homologous of trypsin and  $\alpha$ -amilase from seeds of rye (*Secale cereale* L.). *Biochim. Biophys. Acta*, 915: 305-13.
- Macedo, M. L. R. e Xavier-Filho, J. (1992). Purification and partial characterization of trypsin inhibitors from seeds of *Clitoria ternatea*. *J. Sci. Food. Agric.*, 58: 55-58.
- Madden, M. A.; Tan-Wilson, A. L. e Wilson, K. A. (1985). Proteolysis of soybean Bowman-Birk trypsin inhibitor during germination. 24: 2811-15.
- Mc Grain, A. K.; Chen, J. C.; Wilson, K. A. e Tan-Wilson, A. L. (1989). Degradation of trypsin inhibitors during soybean germination. *Phytochemistry*, 28: 1013-1017.
- Mc Grain, A. K.; Chen, J. C.; Wilson, K. A. e Tan-Wilson, A. L. (1992). Proteases catalyzing processing and degradation of Kunitz soybean trypsin inhibitor during seed maturation. *Phytochemistry*, 31:421-6.
- Mansfeld, V.; Rybák, M.; Horakova, Z. e Hladovec, J. (1960). Die antitryptische, antifibrinolytische Aktivitaet natuerlicher Proteasen-Inhibitoren. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.*, 318, 6-11.

- Mansheed, J.W. (1983). Antimicrobial Compounds. In: Biochemical Plant Pathology. Callow, J. A. Editor. Ed. John Willey e Sons Ltda.
- Mares, M.; Meloum, B.; Pavlik, M.; Kostra, V. e Bauds, M. (1989). Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family. *FEBS Lett.*, 251: 94-8.
- Martins, F.R. (1979). O método de quadrantes e a fitossociologia de uma floresta residual do interior do Estado de São Paulo. Parque Estadual de Vassununga. Tese de Doutorado. UNICAMP. Campinas. 239p.
- Matsuo, M.; Hamato, N.; Takano, R.; Kamel-Hayashi, K.; Yasuda-Kamatani, Y.; Nomoto, K. e Hara, S. (1992). Trypsin inhibitor from bottle gourd (*Lagenaria leucantha* Rusby var. *depressa* Makino) seeds. Purification and aminoacid sequences. *Biochem. Biophys. Acta*, 1120 : 187-192.
- Means, G. E.; Ryan, D.S. e Feeney, R. E. (1974). Protein inhibitors of proteolytic enzymes. *Acc. Chem. Res.*, 7: 315-320.
- Menegatti, E.; Tedeschi, G.; Ronchi, S.; Bortolotti, F.; Ascenzi, P.; Homas, R.M.; Bolognesi, M. e Palmieri, S. (1992). Purification, inhibitory properties and aminoacid sequence of a new serine proteinase inhibitor from white mustard (*Sinaps alba* L.) seed. *FEBS Lett.* 301:10-14.
- Mohoney, W. C.; Hermodson, M. A.; Jones, B.; Poweers, D. D.; Corfman, R. S. e Reeck, G. R. (1984). Aminoacid sequence and secondary structural analysis of the corn inhibitor of trypsin and activated Hageman factor. *J. Biol. Chem.*, 259: 8412-8416.
- Morrison, J.F. (1982). The slow-biding and slow tight-biding inhibition of enzyme-catalyzed reactions. *TIBS*, march , p. 102-105.
- Mundy, J.; Hejgaard, J. e Svendsen, J. (1984). Characterization of a bifunctional wheat inhibitor of endogenous  $\alpha$ -amylase and subtilisin. *FEBS Lett.* 167: 210-14.
- Murdock, L. L.; Huesing, I. E.; Nielsen, S. S.; Prade, R. C. e Hade ,R. E. (1990). Biological Effects of Plant lectins on the cowpea weevil. *Phytochemistry*, 29: 85-89.
- Nau, H. e Biemann, K. (1976). Amino acid sequencing by gas chromatography-mass spectrometry using trifluoro-dideuteroalkylated peptide derivatives C. The primary structure of the carboxypeptidases inhibitor from potatoes. *Anal. Biochem.* 73: 175-186.

- Nazawa, H.; Yamagata, H.; Aizono, Y.; Yoshikawa, M. e Iwasaki, T. (1989). The complete aminoacids sequence of a subtilisin inhibitor from adzuki beans (*Vigna angularis*). J. Biochem., 106:1003-1008.
- Neurath, H. e Walsh, K.A. (1976). Role of Proteolytic Enzymes in Biological Regulation (A Review). Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 73: 3825-32.
- Neurath, H. (1983). Evolution of Proteolytic Enzymes. Science. 224:350-7.
- Niber, B. T.; Helenivs, J. e Varis, A-L. (1992). Toxicity of plant extracts to three storage beetles (*Coleoptera*). J. Appl. Ent. 113: 202-208.
- Nozawa, H.; Yamagata, H. e Iwasaki, T. (1992). Reconstitution of the reactive form from the amino and carboxy-terminal fragments of reactive site-modified subtilisin inhibitor of adzuki beans (*Vigna angularis*). J. Biochem., 111:456-9.
- Odani, S. e Ikenaka, T. (1977). Studies on Soybean Trypsin Inhibitors. X. Isolation and Partial Characterization of four Soybean Double-Headed Proteinase Inhibitors. J Biochem. 82:1513.
- Odani, S.; Ono, T. e Ikenaka, T. (1979). Proteinase inhibitors from a Mimosoideae legume, *Albizzia julibrissim*, J. Biochem., 86:1795-805.
- Odani, S.; Koide, T. e Ono, T. (1983). The complete aminoacid sequence of barley trypsin inhibitor. J. Biol. Chem., 258: 7998-8003.
- Oliva, M. L. V. (1986). Isolamento e caracterização preliminar de inibidores de proteinase de sementes de *Enterolobium contortilium*, *Torresea cearensis*, *Bauhinia pentandra* e *Bauhinia bauhinoides*. São Paulo,. Tese de Doutorado. Escola Paulista de Medicina.
- Oliva, M. L. V.; Sampaio, M. U. e Sampaio, C. A. M. (1987). Serine an SH-proteinase inhibitors from *Enterolobium contortilium* beans. Purification and preliminary characterization. Brazilian J. Med. Biol. Res., 20 : 767-770.
- Oliva, M. L. V.; Sampaio, M. U. e Sampaio, C. A. M. (1988a). Purification and partial characterization of thiol proteinase inhibitor from *Enterolobium contortilium* Beans. Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 369: 229-232.

- Oliva, M. L. V.; Sampaio, M. U. e Sampaio, C. A. M. (1988b). Isolation and characterization of plant inhibitors directed against plasma kallikrein and factor XII. *Adv. Med. Exp. Biol.* 247A: 467-71.
- Orf, J.H. e Hymowitz, J. (1979). Genetics of the Kunitz trypsin inhibitor. An antinutritional factor in soybean. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56:722.
- Osborn, T. C.; Alexander, D. C.; Sun, S. S. M.; Cardona, C. e Bliss, F. A. (1988). Inseticidal Activity and Lectin Homology of Arcelin Seed Protein. *Science* , 240.
- Osowole, O. A; Tonukari, J. N. e Uwaifo, A. O. (1992). Isolation and partial characterization of pigeon pea protease inhibitor: it effect on the genotoxic action of aflatoxin B1. *Biochem. Pharmacol.* 43: 1880-2.
- Otsuka, A.S. e Price, P.A. (1974). Removal of proteases from DNases I by chromatography over agarose with covalently attached Lima-bean protease inhibitor. *Anal. Biochem.*, 62: 180-187.
- Pagano, S. N.; Leitão-Filho, H. F. e Shephererd, G. J. (1987). Estudo fitossociológico em mata mesófila semidecídua no município de Rio Claro (Estado de São Paulo). *Rev. Bras. Bot.*, 10: 49-61.
- Palermo, A. (1986). Informações suscintas sobre algumas espécies vegetais. CESP, SP, p. 4.
- Papastoitisis, G. e Wilson, K.A. (1991). Initiation of the degradation of the soybean Kunitz and Bowman-Birk trypsin inhibitors by cysteine protease. *Plant Physiol.*: 1086-1092.
- Pearce, G.; Strydom, D.; Johnson, S. e Ryan, C.A. (1991). A Polypeptide from Tomato leaves Induces Wound-Inducible Proteinase Inhibitor Proteins. *Science* 25: 893-897.
- Pearce, G.; McGinnis, J. e Ryan, C.A. (1979). Utilization by chicks of half-cystine from native and denatured proteinase inhibitor protein from potatoes. *Proc. Soc .Exp. Biol .Med.* 160: 180-184.
- Pearson , L. e Lipman, A. (1988). Improved tools for biological sequence analysis. *PNAS.* 85: 2444-2448.
- Perlmann, G. E e Lorand, L. (1970). Proteolytic enzymes. *Meth. Enzymol.* 19: 31-838.

Pinski , A. e Schwimmer , V.H. (1974). A trypsin and chymotrypsin inhibitor from seeds of *Bauhinia purpurea*. *Phytochemistry*, 13: 779-783.

Pio-Correa, M.(1969). Unha de boi. In: Dicionário de plantas úteis do Brasil. Vol. VI, p.338-341.

Pio-Correa, M. (1978). Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, Serviço de Informação Agrícola.

Plunkett, G. e Ryan, C.A. (1980). Reduction and caboxymethylation of the single disulfide bond of proteinase inhibitor I from potatoes tubers. *J. Biol. Chem.*, 255: 2752-55.

Plunkett, G.; Senear, D.F.; Zuroske, G. e Ryan, C.A. (1982). Proteinase inhibitors I and II from leaves of wounded tomato plants: purification and properties. *Arch. Biochim. Biophys.*, 213:463-72.

Poerio, E.; Carrano, L.; Garzillo, A.M. e Buonocore, V. (1989). A trypsin inhibitor from the water-soluble protein fraction of wheat kernel. *Phytochem.* 28: 1307-1311.

Powers, J.C. e Harper, J.W. (1986). Inhibitors of serine proteinase. IN: Barret, J. e Salvesen, G. Proteinase Inhibitors. Amsterdam, Elsevier, p: 55-56.

Prahbu, S. K; Saldanha, K. e Pattabiraman, N. T (1984). Natural Plant Enzyme Inhibitors: A Comparative Study of the Action of Legume Inhibitors on Human and Bovine Pancreatic Proteinases. *J. Sci. Food. Agric.* 35: 314-321.

Prakash, D.; Misra, P. N. e Misra, P. S (1991). Variation in protein and trypsin inhibitor activity with maturity and aminoacid composition of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) seeds. *J. Sci. Food. Agric.* 57: 623-6.

Pusztai, A. (1966). The isolation of two proteins, glycoprotein I and a trypsin inhibitor, from seeds of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Biochem. J.*, 238, 2976-2982.

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

- Puztai, A.; Grant, G.; Stewart, J. C. e Watt, W.B.(1988). Isolation of soybean trypsin inhibitors by affinity chromatography on anhydrotrypsin-sepharose 4 B. *Anal. Biochem.* 172:1 108-1112.
- Ramasarma, P. R; Rao, A. G. A. e Rao, D. R. (1995). Role of disulfide linkages in structure and activity of proteinase inhibitor from horsegram (*Dolichos biflorus*). *Biochem. Biophys. Acta.*, 1248: 35-42.
- Rascon, A.; Seidl, D.S.; Jaffe, W.G. e Aizaman, A. (1985). Inhibition of trypsins and chymotrypsins from different animal species: A comparative study. *Comp. Biochem. Physiol.* 82b: 375-378.
- Rayasduarte, P.; Bergeron, D. e Nielsen, S. (1992). Screening of heat-stable trypsin inhibitors in dry beans and their partial purification from great northern beans (*Phaseolus vulgaris* L.) using anhydrotrypsin Sepharose affinity chromatography. *J. Agric. Food. Chem.*, 40: 32-42.
- Rickauer, M.; Fournier, J. e Esquerre-Tugayemm- T. (1989). Induction of proteinase inhibitors in tobacco cell suspension culture by elicitors of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Plant Physiol.* 90: 1065-1070.
- Ridi, J. P. (1983) Cell walls and others structural barriers in defense. In: *Biochemical Plant Pathology*. Callow, J. P. Editor. Ed. Willey e Sons Ltd.
- Richardson, M. (1977). The proteinase inhibitors of plants and microorganisms. *Phytochemistry*, 16:159-169.
- Richardson, M. (1979). The complete aminoacid sequence and the trypsin reactive (inhibitory) site. *FEBS Lett.* 104:322-26.
- Richardson, M.; Campos, F. A. P.; Xavier-Filho, J.; Macedo, M. L. R.; Maia, G. M. C. e Yarwood, A. (1986). The amino acid sequence and reactive (inhibitory) site of the major trypsin isoinhibitor (DE5) isolated from seeds of the Brazilian caroline tree (*Adenanthera pavonina*). *Biochim. Biophys. Acta.* 872: 134-140.
- Richardson, M. (1991). Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: Methods in Plant Biochemistry, vol. 5 , Aminoacids, proteins and nucleic acids (ED. L. J. Rogers).

- Ryan, C.A. e Balls, A. K (1962). An inhibitor for chymotrypsin from *Solanum tuberosum* and its behavior toward trypsin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48, 1839-1844.
- Ryan, C.A. (1966). Chymotrypsin inhibitor I from potatoes: reactivity with mammalian, plant, bacterial and fungal proteinases. Biochemistry. 5: 1592-1596.
- Ryan, C.A. (1967). Quantitative determination of soluble cellular proteins by radial diffusion in agar gels containing antibodies. Anal. Biochem., 19:434-40.
- Ryan, C.A. (1973). Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. Ann. Rev. Plant. Physiol. 24:173-96.
- Ryan, C.A. (1981). Proteinase Inhibitors. In: Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise. Vol. 6 Proteins and nucleic acids. (Abraham Marcus, ed.), Academic Press, New York.
- Ryan, C.A. (1984). Defense Response of Plants. In: Genes Involved in Microbe-Plant Interactions. Edited by D.P.S. Verma e Th.Hohn. Springer-Verlag Wien New York, p. 375-86.
- Ryan, C.A. (1990). Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 28: 425-49.
- Sakato, K.; Tanaka, H. e Misawa, M. (1975). Broad-specificity proteinase inhibitors in *Scopolia japonica* (*Solanaceae*) cultured cells. Isolation, physicochemical properties, and inhibition kinetics. Eur. J. Biochem., 55: 211-19.
- Sallai, R.C. (1993). Caracterização de inibidores seletivos de serinoproteinase no Gênero *Bauhinia* (Leguminosae:Caesalpinoideae). São Paulo. Dissertação de Mestrado- Escola Paulista de Medicina.
- Salvesen, G. e Nagase, M. (1989) Inhibition of proteolytic enzymes. In: Beynon, R.J. e Bond, J.S. Proteolytic Enzymes: A practical approach. Oxford, IRL Press, p: 83-104.
- Sampaio, C. A. M.; Sampaio, M. U. e Prado, E. S. (1984). Active tritration of horse urinary kallikrein. Hoppe- Seylers Z. phys. chem. 365:297-302.
- Sampaio, M. U.; Tanaka, A. S.; Oliva, M. L. V.; Batista, I. F. C.; Motta, G.; Stella, R. C. R. e Sampaio, C. A. M. (1990). Plant proteinase inhibitors. Action on blood

clotting contact phase enzymes. Proceedings of the First Brazilian Congress on Proteins (Benedito Oliveira Filho e Valdemiro Sgarbieri ed) p. 56-65.

Sampaio, C. A. M.; Motta, G.; Sampaio, M. U.; Oliva, M. L. V.; Araujo, M. S.; Stella, R. C. R.; Tanaka, A. S. e Batista, I. F. C. (1992). Action of plants inhibitors on enzymes of the kallikrein kinin system. Agents actions. Contributions to Autocoide Pharmacology. Birkhauser Verlag Basel eds.

Sampaio, C. A. M.; Oliva, M. L. V.; Sampaio, M. U.; Batista, I. F. C.; Buena, N. R.; Tanaka, A. S.; Auerswald, E. A. e Fritz, H. (1996). Plant serine proteinase inhibitors. Structure and biochemical applications on plasma kallikrein and related enzymes. Immunopharmacology, 32: 62-66.

Schmutterer, H.(1990). Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. Ann. Rev. Entomol. 35: 271-297.

Seidl, D. S.; Lorenzo, P.; Pinelli, B. E. e Tovar, J. (1988). Subtilisin inhibitors in legume seeds. Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 369: 69-74.

Shapiro, A. L.; Vinuela, E. e Maelzel, J. V. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chain by electrophoresis in SDS- polyacrylamide gels. Biochim. Biophys. Res. Commun. 28: 815-819.

Shibata, H.; Hara, S.; Ikenaka, T. e Abe, J. (1986). Purification and characterization of proteinase inhibitors from winged beans (*Psophocarpus tetragonolobus* L.) seeds. J. Biochem., 99: 1147-55.

Shivaraj, H.; Nayana, R. e Thillaisthanam, N. P (1982). Natural Plant Enzyme Inhibitors. Isolation of a Trypsin/ alfa-amylase Inhibitor and a Chymotrypsin/Trypsin Inhibitor from Ragi (*Eleusine coracana*) grains by Affinity Chromatography and study of their Properties. J. Sci. Food. Agric. 33: 1080-1091.

Skoog, B. e Wichman, A. (1986) Trends in analytical chemistry, 5(4), 82./

Souza, E. M. T.; Mizuta, K.; Sampaio, M. U. e Sampaio, C. A. M. (1995). Purification and partial characterization of a *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor. Phytochemistry 39: 521-525.

Stenman, U-H; Koivumen, E. e Uvento, M. (1988). Characterization of a tumor-associated serine protease. Biol. Chem.Hoppe-Seyler, 369: 9-14.

- Strong, D. R.; Lawton, J. H. e Southwood, R. (1984). Insects and Plants community Patterns and Mechanisms. Harvard University Press, Cambridge, Massachussets.
- Strukelj, B.; Pungercar, J.; Mesko, P.; Maganja-Barlic, D. e Gubensek, J. (1992). Characterization of aspartic proteinase inhibitors from potato at the gene, cDNA and proteins levels. Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 373: 477-482.
- Stahlhut, R. W. e Hymowitz, T. (1983). Variation in the low molecular weight proteinase inhibitors of soybeans. Crop Sci. 23: 766.
- Suzuki, K.; Kusumoto, H.; Nishioka, J. e Komiyama, Y. (1990). Bovine plasma protein C inhibitor with structural and functional homologous properties to human plasma protein C inhibitor. J. Biochem., 107: 381-88.
- Tanaka, A. S.; Sampaio, M. U.; Sampaio, C. A. M. e Oliva, M. L. V. (1989). Purification and preliminary characterization of *Torresea cearensis* trypsin inhibitor. Brazilian J. Med. Biol. Res. 22: 1069-71.
- Tanaka, A. S. (1991). Purificação, determinação de especificidade e aspectos estruturais do inibidor de serinoproteinases das sementes de *Torresea cearensis*. São Paulo. (tese de mestrado em biologia molecular- Escola Paulista de Medicina).
- Tanaka, A. S. (1993). Inibidor de tripsina (Bowman-Birk) de sementes de *Torresea cearensis*. Determinação da estrutura primária e estudos comparativos com o inibidor de tripsina de sementes de *Torresea acreana*. Tese doutorado- Escola Paulista de Medicina, São Paulo, S.P.
- Tan-Wilson, A. L.; Rightmire, B. e Wilson, K. A. (1982). Different rates of metabolism of soybean proteinase inhibitors during germination. Plant Physiol. 70: 493-97.
- Tan-Wilson, A. L.; Hartl, P. M.; Delfel, N. E. e Wilson, K. A. (1985). Differential expression of Kunitz and Bowman-Birk soybean proteinase inhibitors in plant and callus tissue. Plant Physiol. 78: 310-14.
- Teixeira, A. V.; Dowdle, E. B. D. e Botes, D. P. (1994). Synthesis and expression of a gene coding for *Erythrina* trypsin inhibitor (ETI). Biochem. Biophys. Acta. 1217: 16-22.
- Travis, J. e Salvessen, G. S. (1983). Human Plasma Proteinase Inhibitors. Ann. Rev. Biochem., 52: 655-709.

- Tsunaogae, Y.; Tanaka, I.; Yamane, T.; Kikkawa, J-I.; Ashida, T.; Ishikawa, C.; Watanabe, K.; Nakamura, S. e Takahashi, K. (1986). Structure of the Trypsin-Binding domain of Bowman-Birk type protease inhibitor and its interaction with trypsin. *J. Bio. Chem.* 100: 1637-1646.
- Uriel, J. e Berges, J. (1968). Characterization of natural inhibitors of trypsin and chymotrypsin by electrophoresis in acrylamide- agarose gels. *Nature*. 218: 578-580.
- Vigers, A. J.; Roberts, W. K. e Selitrennikoff, C. P. (1991). A new Family of Plant Antifungal Proteins. *Molecular Plant - Microbe Interactions*, Vol. 4:315-23.
- Xavier-Filho, J. (1992). The biological Roles of Serine and Cysteine Proteinase inhibitors in Plants. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 4:1-6.
- Xavier-Filho, J. e Ventura, M. M. (1988). Trypsin inhibitors in Cowpea: A Review. *Comments Agric. e Food Chemistry*. 1: 239-264.
- Walsh, T. A. e Twitchell, P. (1991). Two Kunitz-type proteinase inhibitors from potato tubers. *Plant. Physiol.* 97: 15-18.
- Weber, K. e Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determination by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406- 4412.
- Weder, J. K. P. (1978). Occurrence of proteinase inhibitors in Mimosoideae. *Z. Pflanzen Physiol. Bd.* 90: 285-291.
- Weder, J. K. P. (1981). Protease inhibitors in the Leguminosae. In: Advances in Legume Systematics (ed. R.M. Polhill e P. H. Raven), pp- 533-560.
- Weder, J. K. P.; Mueller, R. e Kahleyss, R. (1992). Lentil Proteinase Inhibitors: Reaction with human enzymes and significance. In: Proc. First European Conference on grain Legumes, Angers/ France, june-13, p. 455-456.
- Werner, M. H. e Wemmer, D. E. (1992). Three dimensional structure of soybean trypsin/ chymotrypsin Bowman-Birk inhibitor in solution. *Biochemistry*. 31: 999-1010.
- White, A.; Handler, P. e Smith, E. L. (1986). .Enzimas Hidrolíticas. In: Princípios de Bioquímica. Ed. Guanabara Koogan.p.183.

- Whitley, E. J. e Bowman, D. E. (1975). Isolation and properties of navy beans Proteinase Inhibitor. Component I. Arch. Biochem. Biophys., 169: 42-50.
- Wieczorek, M.; Otlewski, J.; Cook, J.; Parks, K.; Leluk, I. e Wilimowskapelc, A. (1985). The squash family of serine proteinase inhibitors. Amino acids sequences and association equilibrium constants of inhibitors from squash, summer squash, zuochini and cucumber seeds. Biochem. Biophys. Res. Commun. 126: 646-652.
- Willians, T. J. (1979). Prostaglandin E<sub>2</sub>, prostaglandin I<sub>2</sub> and the vascular changes in inflammation. Br. J. Pharmacol. 65:517-524.
- Wilson, K. A. e Chen, I. C. (1983). Amino acid sequence of mung bean trypsin inhibitor and its modified forms appearing during germination. Plant Physiol., 71: 341-49.
- Wilson, K. A. e Tan-Wilson, A. L. (1987). Characterization of proteinase that initiates the degradation of the trypsin inhibitor in germinating mung beans (*Vigna radiata*). Plant Physiol. 84: 93-98.
- Wilson, K. A.; Papatoitsis, G.; Hartl, P. e Tan-Wilson, A. L. (1988). Survey of the proteolytic activities degrading the Kunitz trypsin inhibitor and glycinin in germination soybeans (*Glycine max*). Plant Physiol. 88: 355-60.
- Wingate, V. P. M.; Francescchi, V. R. e Ryan, C. A. (1991). Tissue and celular localization of proteinase inhibitors I and II in the fruit of wild tomato, *Licopersicum peruvianum* L. Mill. Plant. Phisiol. 97: 490-5.
- Wu, C. e Whitaker, J. R. (1991). Homology among trypsin chymotrypsin inhibitors from red kidney bean, Brazilian pink bean, lima bean and soybean. J. Agric. Food Chem. 39: 1583-9.
- Wu, C. e Whitaker, J. R. Binding and cleavage by trypsin and chymotrypsin at the reactive sites of proteinase inhibitors from Brazilian pink beans (*Phaseolus vulgaris*, var. rosinha-G2). J. Agric. Food. Chem. 39: 1743-51.
- Yamamoto, M.; hara, S. e Ikenaka, T. (1993). Amino acid sequences of two trypsin inhibitors from winged bean seeds (*Psophocarpus tetragonolobus*) (L.). J. Biochem. 94: 849-863.

Yoshikawa, M. ; Iwasaki, T.; Fuji, M.; Oogaki, M. (1976). Isolation and some properties of a subtilisin inhibitor from barley. J. Biochem, 79: 765.

Yoshikawa, M. (1983). Macromolecules recognition and the triggering of resistance. In: Biochemical Plant Pathology. Callow, J. A. Editor. Ed. John Willey e Sons Ltda.

Yu, Y. G.; Chung, C. H.; Fowler, A. e Suh, S. W. (1988). amino acid sequence of a probable amylase proenzyme inhibitor from rice seeds. Arch. Biochem. Biophys. 265: 466-475.