

SILVANA CRISTINA PANDO

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UM
INIBIDOR DE SERINOPROTEINASES DE SEMENTES DE
Delonix regia (FLAMBOYANT)

Campinas -SP

1999

9908585

UNIDADE	BC
N.º CPMADA	101
V.	1912
Ex.	
TOMBO	BC/3+216
PROC.	229/99
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	02/04/99
N.º CPD	

CM-00121873-3

SILVANA CRISTINA PANDO

DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I B.

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UM INIBIDOR DE
SERINOPROTEINASES DE SEMENTES DE *Delonix regia*
(FLAMBOYANT)

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas - Área de Bioquímica

Este exemplar corresponde à redação final

da tese defendida pelo(a) candidato(a)

Silvana Cristina Pando

e aprovada pela Comissão Julgadora

38/01/99

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Marangoni

Campinas -SP

1999

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

P192p Pando, Silvana Cristina
Purificação e caracterização parcial de um inibidor de
serinoproteinases de sementes de *Delonix regia* (Flamboyant)
/ Silvana Cristina Pando. -- Campinas, SP : [s.n.], 1999.

Orientador : Sérgio Marangoni.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas , Instituto de Biologia.

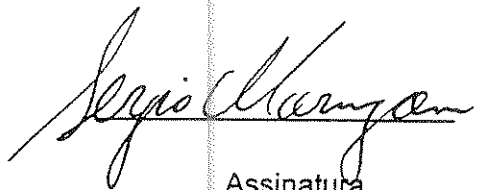
1. Tripsina. 2. Inibidores da tripsina. 3. Calicreina.
4. Serina proteinases. 5. Leguminosa. I. Marangoni,
Sérgio. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 28 de Janeiro de 1999.

BANCA EXAMINADORA:

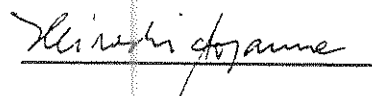
TITULARES:

Prof. Dr. Sérgio Marangoni



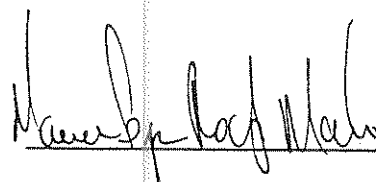
Assinatura

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama



Assinatura

Prof. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo



Assinatura

SUPLENTE:

Prof. Dr. José Camillo Novello

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni pela oportunidade e pela orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Camillo Novello e ao Prof. Dr. Benedito Oliveira Filho pela oportunidade e pela colaboração.

Ao Prof. Dr. Hiroshi Aoyama pelas valiosas sugestões apresentadas durante a elaboração deste trabalho.

À Prof. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela amizade, incentivo e sugestões dadas durante a realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Maria Luiza Vilela Oliva, da Universidade Estadual de São Paulo, pela colaboração.

À minha irmã Luzia Pando e à amiga Luciana Di Ciero Toledo Leme pela valiosa ajuda, amizade e pelo incentivo que tornaram possível a realização deste trabalho.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica pelo agradável convívio e que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos docentes do Departamento de Bioquímica pelos ensinamentos.

Ao Paulo Baldasso pelo apoio técnico, pela amizade e dedicação sempre constantes.

À minha família pelo amor, dedicação e incentivo.

À CAPES e FAEP-UNICAMP pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

ABREVIACÕES	i
ABREVIACÕES PARA AMINOÁCIDOS	ii
RESUMO	1
SUMMARY	2
INTRODUÇÃO	3
Enzimas Proteolíticas: Aspectos Gerais.....	3
Inibidores de Proteinases: Aspectos Gerais.....	4
Classificação dos Inibidores de Serinoproteinases.....	6
Mecanismo de Inibição das Serinoproteinases.....	8
Aplicação dos Inibidores de Proteinases.....	9
Mecanismos Fisiológicos Controlados por Inibidores de Serinoproteinases.....	10
Papel dos Inibidores nas Sementes.....	13
Família Leguminosae.....	17
OBJETIVOS	19
MATERIAIS	20
MÉTODOS	21
1. DOSAGEM ENZIMÁTICA	21
Hidrólise de substratos cromogênicos.....	21
Determinação das concentrações de tripsina e quimotripsina ativas	21
2. PURIFICAÇÃO DO INIBIDOR A PARTIR DAS SEMENTES DE <i>Delonix regia</i>	21
Extração salina	21
Precipitação das proteínas por acetona 80%.....	22

Cromatografia de troca iônica em DEAE Sephadex A-50.....	22
Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75.....	22
Cromatografia de troca iônica em DEAE 5PW.....	22
3. EXTRAÇÃO ÁCIDA DO INIBIDOR DE <i>Delonix regia</i>	23
Determinação da atividade da tripsina.....	23
Determinação da atividade do inibidor sobre tripsina.....	23
4. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DO INIBIDOR DE <i>Delonix regia</i>	24
Medida da inibição sobre tripsina bovina e porcina.....	24
Medida da inibição sobre quimotripsina.....	24
Medida da inibição sobre calicreína plasmática humana.....	24
Medida da inibição sobre plasmina humana.....	25
Medida da inibição sobre o fator Xa humano.....	25
5. DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE INIBIÇÃO.....	25
6. DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	26
7. ELETROFORESE EM SDS-PAGE.....	27
8. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR APARENTE DO INIBIDOR.....	27
9. CRISTALIZAÇÃO DO INIBIDOR DE <i>Delonix regia</i>	27
Coleta e processamento dos dados.....	27
RESULTADOS.....	29
1. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DO INIBIDOR DE <i>Delonix regia</i>	29
Inibição da tripsina bovina e porcina.....	29
Inibição da calicreína plasmática humana.....	29

2. DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE INIBIÇÃO.....	32
3. PURIFICAÇÃO DO INIBIDOR.....	33
Cromatografia de troca iônica em DEAE Sephadex A-50.....	33
Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75.....	34
Cromatografia de troca iônica em DEAE 5PW (HPLC).....	35
Controle do rendimento de purificação do inibidor.....	36
4. ELETROFORESE EM SDS-PAGE.....	37
5. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR APARENTE DO INIBIDOR.....	39
6. CRISTALIZAÇÃO DO INIBIDOR.....	40
DISCUSSÃO.....	42
CONCLUSÃO.....	48
COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS.E PUBLICAÇÕES.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das vias intrínseca, extrínseca e comum da cascata da coagulação sanguínea.....	12
Figura 2. Exemplar adulto de <i>Delonix regia</i>	18
Figura 3. Amostra do fruto e sementes de <i>Delonix regia</i>	18
Figura 4. Curva de inibição da tripsina bovina pelo extrato salino de <i>Delonix regia</i>	30
Figura 5. Curva de inibição da tripsina porcina pelo extrato salino de <i>Delonix regia</i>	30
Figura 6. Curva de inibição da tripsina bovina pelo precipitado acetônico de <i>D. regia</i>	31
Figura 7. Curva de inibição da calicreína plasmática humana pelo inibidor de <i>D. regia</i>	31
Figura 8. Cromatografia de troca iônica em DEAE Sephadex A-50.....	34
Figura 9. Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75.....	35
Figura 10. Cromatografia de troca iônica em DEAE 5PW (HPLC).....	36
Figura 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida (10-20%) das etapas iniciais de isolamento do inibidor.....	38
Figura 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida (10-20%) do inibidor purificado	38
Figura 13. Determinação da massa molecular aparente do inibidor de <i>Delonix regia</i> através de eletroforese em gel de poliacrilamida (10-20%).....	39
Figura 14. Estrutura dos inibidores de tripsina do tipo Kunitz de sementes de <i>Erythrina caffra</i> (A) e de <i>Delonix regia</i> (B).....	41

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das proteinases de acordo com a natureza dos seus sítios ativos.....	3
Tabela 2. Constantes de inibição do inibidor de <i>Delonix regia</i>	32
Tabela 3. Purificação do inibidor de <i>Delonix regia</i>	37

ABREVIATÓES

AE – atividade específica

APANA – acetil-fenilalanina-arginina-p-nitroanilida

APNE – acetil-fenilalanina-naftil-ester

BAPNA – N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida

BTEE – N-benzoil-L-tirosina-etil-ester

BTPNA – N-benzoil-L-tirosina-p-nitroanilida

CC – coeficiente de correlaçaõ

DEAE – dietilaminoetil

DMSO – dimetilsulfoxido

DrTI – inibidor de tripsina de *Delonix regia*

DTT – ditiotreitól

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

HuPK – calicreína plasmática humana

kDa – kilodalton

Ki – constante de inibiçaõ

NPGB – p-nitrofenil-p'-guanidinobenzoato

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

PEG - fosfoetilenoglicól

PSA – persulfato de amônio

S 2222 – N-benzoil-L-isoleucil-L-glutamil-glicil-L-arginina-p-nitroanilida

S 2251 - H-D-valil-L-leucil-L-lisina-p-nitroanilida

S 2302 – H-D-prolil-L-fenilalanina-L-arginina-p-nitroanilida

SBTI – inibidor de tripsina de soja

SDS – dodecil sulfato de sodio

TEMED – N-N'-N'- tetrametilenodiamina

TRIS – hidroximetil aminometano

ABREVIACÕES PARA AMINOÁCIDOS

Aminoácidos	Abreviação (3 letras)	Símbolo
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	Hys	H
Isoleucina	Iso	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

Nomenclatura IUPAC

RESUMO

No presente trabalho foi investigado um inibidor de proteinases em sementes da espécie *Delonix regia* (Leguminosae-Caesalpinioideae).

As sementes das leguminosas contêm uma alta concentração de proteína em relação aos outros componentes da planta. Dentre essas proteínas, os inibidores de proteinases, particularmente inibidores de enzimas da família das serinoproteinases (que inclui tripsina, quimotripsina e enzimas da coagulação sanguínea), exercem uma importante função na fisiologia da planta.

Os inibidores de proteinases têm sido estudados há mais de 50 anos. Eles têm mostrado ser muito importantes no tratamento de disfunções metabólicas associadas às enzimas proteolíticas, tais como em casos de pancreatites, efizemas, alergias, inflamação, hipertensão e câncer.

O inibidor de *Delonix regia* (DrTI) foi isolado em solução salina 10% (p/v), submetido a uma precipitação por acetona 80% (v/v) e purificado através de cromatografias de troca iônica (Sephadex A-50 e DEAE 5PW) e de exclusão molecular (Sephadex G-75).

O DrTI inibiu tripsina bovina e porcina e a calicreína plasmática humana. Os valores de K_i encontrados foram $2,19 \times 10^{-8} \text{M}$, $4,53 \times 10^{-8} \text{M}$ e $5,25 \times 10^{-9} \text{M}$, respectivamente.

A pureza do inibidor foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida (10-20%), na presença de SDS. O inibidor apresentou uma única banda de proteína em condições nativas e reduzidas (0,1M DTT). Estes resultados indicam que o DrTI é constituído por uma única cadeia polipeptídica. A massa molecular aparente do inibidor foi de 22 kDa, um resultado similar aos inibidores de proteinase do tipo Kunitz.

O DrTI foi submetido a estudos cristalográficos e seu modelo permitiu comparação estrutural com o inibidor de tripsina do tipo Kunitz isolado de sementes de *Erythrina caffra*.

SUMMARY

In the present work, a proteinase inhibitor in seeds of *Delonix regia* (Leguminosae-Caesalpinioideae) specie, was investigated.

The Leguminosae seeds contain a high concentration of protein in relation to the other components of the plant. Among these proteins, the proteinase inhibitors, particularly enzymes inhibitors of serinoproteinases family (that include trypsin, chymotrypsin and blood coagulating enzymes), play an important role in plant physiology.

Plant inhibitors have been investigated for more than fifty years ago. They have been shown to be very important in the treatment of metabolic disfunctions associated to proteolytic enzymes, such as in cases of pancreatitis, emphysema, allergy, inflammation and cancers.

The *Delonix regia* inhibitor (DrTI) was isolated in saline solution 10% (p/v), after acetonic precipitation 80% (v/v), and purified through ion exchange chromatography (Sephadex A-50 e DEAE 5PW) and molecular exclusion (Sephadex G-75).

DrTI inhibited bovine and porcine trypsin and human plasma kallikrein. The values of K_i found were $2,19 \times 10^{-8}M$, $4,53 \times 10^{-8}M$ and $5,25 \times 10^{-9}M$, respectively.

Purity of inhibitor was detected by polyacrylamide gel electrophoresis (10-20%) in the presence of SDS. The inhibitor displayed a single protein band, in native and reduced conditions (0,1M DTT). These results indicate that DrTI is constituted by a single polipeptide chain. The apparent molecular mass of inhibitor was of 22 kDa, a result similar to the proteinase inhibitors of the Kunitz-type.

DrTI was submitted to crystallographic studies and its model allowed structural comparison to the trypsin inhibitor of the Kunitz-type isolated from *Erythrina caffra* seeds.

INTRODUÇÃO

Enzimas Proteolíticas: Aspectos Gerais

As enzimas proteolíticas ou proteinases são enzimas que catalisam a clivagem de ligações peptídicas de proteínas. Essas proteinases adquiriram um alto grau de especialização durante sua evolução biológica, restringindo seu mecanismo de ação sobre ligações peptídicas específicas (White *et al.*, 1986). Muitos processos biológicos são regulados pela ação de proteinases, por exemplo, coagulação do sangue e fibrinólise, a liberação de proteínas hormonais de precursores moleculares, o transporte de proteínas secretoras através da membrana, ativação do sistema de complemento, fertilização, germinação e controle da digestão proteolítica (Wenzel & Tschesche, 1995; Declerck & Imren, 1994).

As enzimas proteolíticas são indispensáveis para os processos fisiológicos em animais, mas se não forem adequadamente controladas, podem representar um risco em potencial, destruindo componentes protéicos celulares e teciduais. Devido a isso, o equilíbrio entre as enzimas e seus inibidores é um fator essencial para a manutenção de um estado fisiológico normal (Neurath, 1993). Há dois mecanismos básicos de regulação para estas enzimas, um dos quais envolve a ativação de precursores de proteinases inativos (zimogênios), por proteólise limitada, e o outro mecanismo envolve a inativação de proteinases pela formação de complexos com inibidores protéicos específicos (Phillips & Fletterick, 1992; Neurath, 1993).

De acordo com a natureza dos seus sítios ativos, as proteinases compreendem as serinoproteinases I e II, cisteinoproteinases, metaloproteinases I e II e aspartilproteinases, como está apresentado na tabela 1 (Neurath, 1993).

Tabela 1. Classificação das proteinases de acordo com a natureza dos sítios ativos.

Família	Proteinases representativas	Componentes do sítio ativo
Serinoproteinases I	quimotripsina, tripsina, elastase, calicreínas	Asp ₁₀₂ , Ser ₁₉₅ , His ₅₇
Serinoproteinases II	subtilisina	Asp ₃₂ , Ser ₂₂₁ , His ₆₄
Cisteinoproteinases	papaína, actinidina, catepsinas B e H de fígado de rato	Cys ₂₅ , His ₁₅₉ , Asp ₁₅₈
Aspartilproteinases	penicilopepsina, pepsina e renina	Asp ₃₃ , Asp ₂₁₃
Metaloproteinases I	carboxipeptidase bovina A e B	Zn, glu ₂₇₀ , Tyr ₂₄
Metaloproteinases II	termolisina	Zn, Glu ₁₄₃ , Tyr ₂₃

A classe de enzimas mais bem estudada e bem caracterizada é a das serinoproteinases, tendo como exemplo a tripsina, quimotripsina e elastase, das quais a mais estudada é a tripsina. Essas enzimas apresentam elevado grau de homologia e mecanismo de catálise semelhante, embora apresentem diferenças acentuadas quanto à especificidade por substratos (Dufton, 1990). Alguns mecanismos de catálise enzimática foram propostos para as serinoproteinases e o mais aceito é o mecanismo da dupla transferência. Neste processo, ocorre a formação de um tetraedro intermediário durante a transferência de prótons do resíduo Ser₁₉₅ para o resíduo His₅₇, e em seguida para o resíduo Asp₁₀₂, precisamente os aminoácidos que compõem o sítio ativo das serinoproteinases. O resultado desse transferência é a formação de uma carga negativa parcial que será a responsável pela catálise enzimática propriamente dita, que ocorre através de um ataque nucleofílico aos radicais carbonila dos resíduos de arginina e lisina dos substratos suscetíveis à tripsina (Warshel *et al.*, 1989).

Inibidores de Proteinases: Aspectos Gerais

Há mais de 50 anos, os processos moleculares que envolvem as enzimas proteolíticas vêm sendo investigados e um dos modelos para elucidar os mecanismos enzimáticos ou de interação proteína-proteína é o estudo dos inibidores de proteinases (Kaslik *et al.*, 1995).

Os estudos de Kunitz (1945, 1946) iniciaram o isolamento dos inibidores de tripsina do pâncreas bovino presentes na soja e demonstraram a natureza dessas proteínas. Em 1947 foi feito o primeiro estudo sistemático de inibidores de proteinases por Borches e Ackerson.

A relação entre inibidores e enzimas proteolíticas fornece informações sobre o comportamento dessas moléculas e, através do estudo de homologia, esse conhecimento é usado para esclarecer os processos evolutivos das proteínas de diferentes espécies (Wu & Whitaker, 1991). Weder (1985), estudou as afinidades filogenéticas entre diferentes espécies e variedades de legumes com base nas informações das estruturas primárias dos inibidores de proteinases.

A determinação das constantes de inibição é uma das formas possíveis para estudar os meios de interação entre os inibidores e suas enzimas alvo (Bode & Huber, 1992).

Os inibidores de enzimas proteolíticas encontram-se amplamente distribuídos em plantas, animais e microrganismos, sendo que os vegetais, de maneira geral, contêm inibidores para quase todos os tipos de enzimas proteolíticas. As sementes, em especial das

leguminosas, contêm grande quantidade de inibidores, cujo papel fisiológico é ainda objeto de discussão (Sampaio *et al.*, 1996). Esses inibidores são deficientes ou destituídos de resíduos de metionina, histidina, triptofano e possuem alto conteúdo de ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina e serina (Kortt & Caldwell, 1990).

A massa molecular desses inibidores vegetais varia de 8 a 25 kDa, sendo moléculas extremamente estáveis, resistentes ao calor, a variações de pH e à proteólise por proteinases diferentes daquelas não inibidas. Esta estabilidade tem sido atribuída em parte às pontes dissulfeto e outras interações não covalentes que também contribuem significativamente para a estabilidade dos inibidores (Belitz & Weder, 1990).

Embora os inibidores sejam compostos termolábeis, alguma atividade residual ainda permanece, mesmo após o tratamento térmico (Churrela *et al.*, 1976). Os inibidores de lentilhas, purificados por Weder & Link (1993), mostraram uma considerável habilidade em inibir tripsina humana (HT) e quimotripsina humana (HCT), após aquecimento.

As sementes de leguminosas são reconhecidas por serem uma excelente fonte de proteínas (Richardson, 1977). As sementes dessas plantas contêm ainda, substâncias antinutritivas, como os inibidores de proteinases, phytohemaglutininas (lectina), taninos, etc., que provocam efeitos adversos quando ingeridos na dieta, podendo interferir direta ou indiretamente na digestão e absorção de proteínas ou por afetar as funções de digestão e absorção das células intestinais limitando, assim, o uso dessas sementes na nutrição humana e animal. Destas substâncias, os inibidores de proteinases são alguns dos compostos antinutritivos mais importantes e que merecem uma atenção especial (Pusztai, 1986).

A descoberta de proteínas termolábeis em soja (*Glycine max*), que inibem a atividade proteolítica da tripsina, levou a conclusão de que os inibidores de tripsina são responsáveis pela baixa absorção das proteínas da soja, quando ingeridos sem tratamento prévio. A utilização de farinha de soja crua em ratos e pintos provoca uma marcante hipertrofia do pâncreas e decréscimo na taxa de crescimento (Birk, 1985). Devido à grande importância dos grãos de legumes como fonte de alimento humano e animal, vários pesquisadores estão concentrando seus estudos nessa área

Classificação dos Inibidores de Serinoproteinases

Os inibidores de serinoproteinases, presentes em plantas, são classificados em famílias através de características de homologia na estrutura primária, massa molecular, conteúdo de cisteína e especificidade inibitória (Frokiaer *et al.*, 1994). As principais famílias de inibidores de serinoproteinases são:

- Inibidores tipo Kunitz (SBTI)

A estrutura primária completa de um inibidor de proteinase do tipo Kunitz, extraído da soja, foi primeiro elucidado por (Koide & Ikenaka, 1973 a,b e Koide *et al.*, 1973). Esses inibidores apresentam uma massa molecular em torno de 20 kDa, aproximadamente 181 resíduos de aminoácidos, incluindo 4 resíduos de cisteína formando 2 pontes dissulfeto, estabilizando a sua estrutura.

A localização do sítio reativo, determinado em inibidores do tipo Kunitz, é sempre na posição Arg(63)-Ile(64) em soja (Koide & Ikenaka, 1973a; Yamamoto *et al.*, 1983; Richardson *et al.*, 1986; Joubert & Dowdle, 1987), enquanto que inibidores isolados de *Acacia confusa* possui os resíduos de Arg(64)-Ile(65) no seu sítio reativo (Wu & Lin, 1993).

Os inibidores do tipo Kunitz, ocorrem predominantemente nas sementes de leguminosas, porém não estão restritos a essa fonte, pois já foram encontrados também em batatas e cereais (Richardson, 1991).

Entre as funções fisiológicas atribuídas a esse grupo de inibidores, uma delas seria a de proteína de defesa das sementes, por serem potentes inibidores de enzimas digestivas como tripsina e quimotripsina, presentes no trato digestivo de microrganismos, vertebrados e invertebrados (Jordão *et al.*, 1996). Além disso, também são atribuídas funções como proteínas de reserva ou de regulação endógena das sementes (Hartl *et al.*, 1986).

- Inibidores tipo Bowman-Birk

Os inibidores que compõem a família Bowman-Birk foram os primeiros inibidores de tripsina de sementes a terem sua sequência de aminoácidos determinada. Este tipo de inibidor é amplamente distribuído em sementes de leguminosas e em cereais, principalmente no milho e acredita-se que desempenham papel de proteínas de reserva, além de defesa

contra o ataque de pragas (Richardson, 1991).

As proteínas desta família são caracterizadas por apresentarem massa molecular em torno de 8-12 kDa, aproximadamente 71 resíduos de aminoácidos, dos quais 14 são resíduos de cisteína que formam 7 pontes dissulfeto intramoleculares. Eles são inibidores que apresentam cadeia única com dois sítios reativos (Lys(16)-Ser(17) e Leu(43)-Ser(44). Em geral são conservados os resíduos de arginina nas posições 10 e 38, cuja substituição pode mudar a sua especificidade inibitória (Tanaka *et al.*, 1997).

A presença de dois sítios reativos nesses inibidores os torna capazes de inibir simultaneamente duas moléculas de tripsina ou ainda uma molécula de tripsina e outra de quimotripsina, formando complexos 1:2 (inibidor:tripsina:tripsina) ou 1:1:1 (inibidor:tripsina:quimotripsina) (Tsunogae *et al.*, 1986).

- Inibidores tipo Abóbora

Os inibidores pertencentes a esta família foram descobertos há aproximadamente 20 anos, são os menores inibidores de serinoproteinases de origem vegetal descritos até hoje (Otlewski, 1993). Apresentam aproximadamente 30 resíduos de aminoácidos, massa molecular na ordem de 4000 Daltons e 3 pontes dissulfeto. O sítio reativo desses inibidores é Arg-Ile ou Lys-Ile e inibem principalmente tripsina e fator XIIa (Hara *et al.*, 1989). Apesar dos inibidores do tipo abóbora serem relativamente pequenos, são muito potentes com uma constante de inibição (K_i) de $5,9 \times 10^{-10}$ a $9,5 \times 10^{-11}$, estando entre as menores constantes de inibidores de tripsina já estudados (Wieczorek *et al.*, 1985). Além disso, esses polipeptídeos podem ser utilizados pela indústria farmacêutica como drogas com efeito sobre doenças cardiovasculares (Hayashi *et al.*, 1994; Haldar *et al.*, 1996).

- Inibidores tipo Batata I

Os inibidores pertencentes a esta família são encontrados em tecidos vegetais e animais. A família dos inibidores tipo batata I inclui todas aquelas sequências que mostraram alta homologia com o inibidor quimotríptico isolado de tubérculos de batata (Richardson, 1991). Eles apresentam em torno de 60 resíduos de aminoácidos e apenas uma ponte dissulfeto, o que não impede que esses inibidores se associem para a formação de tetrâmeros (Hejgaard *et al.*, 1994).

A eglina é um exemplo de inibidor desta família e foi isolada da sanguessuga (*Hirudo medicinalis*). É um potente inibidor de elastase e catepsina G, mas não inibe tripsina (Macphalen & James, 1988). É uma das famílias de inibidores mais difundidas. Estão presentes também nas famílias Solanaceae, Gramineae, Leguminosae, Polygonaceae e Cucurbitaceae (Richardson, 1991).

- Inibidores tipo Batata II

Esses inibidores apresentam massa molecular de 12000 Daltons, com 96 a 98 resíduos de aminoácidos e alto conteúdo de cisteína (aproximadamente 6 pontes dissulfeto). O primeiro inibidor tipo batata II, completamente sequenciado, foi o inibidor de tripsina do pericarpo de berinjela (*Solanum melongeni*), sendo também encontrado em batatas, folhas de tomateiro, mostarda e em outros vegetais, porém não há registros da sua presença em sementes (Antcheva *et al.*, 1996).

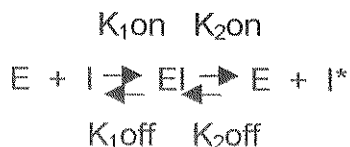
O sítio reativo desses inibidores foi identificado na região molecular Arg(38)-Asp(39). A mesma ligação peptídica foi também encontrada na região homóloga no inibidor de tripsina de batata (PTI-1). Os inibidores tipo batata II tem um grau de homologia muito limitado com as regiões N-terminais dos inibidores de carboxipeptidases da batata e do tomate e por isso são também conhecidos como inibidores de carboxipeptidases (Richardson, 1991). Os inibidores do tipo batata II inibem, principalmente, quimotripsina, tripsina, sendo melhor inibidor para a subtilisina (Plunkett & Ryan, 1980; Plunkett *et al.*, 1982).

Devido ao seu tamanho essas proteínas são excelentes modelos para estudos estruturais realizados em computador (Querol *et al.*, 1993).

Mecanismo de Inibição das Serinoproteinases

A inibição das serinoproteinases por inibidores protéicos, em geral, ocorre através de uma ligação muito forte e altamente específica e que está restrita a uma pequena porção da molécula do inibidor, denominada de sítio reativo. Esta é a principal região da molécula responsável pela sua especificidade inibitória (Creighton & Darby, 1989).

A maioria dos inibidores protéicos de serinoproteinases segue o mecanismo de reação que está representado abaixo:



A principal diferença entre inibidores e substratos está no fato de que os últimos ao serem hidrolisados, dissociam-se rapidamente do centro ativo da enzima, enquanto que os inibidores, em geral, permanecem complexados com a enzima. Nas situações em que o complexo enzima-inibidor se desfaz, a enzima pode formar novamente a ligação peptídica desfeita através de uma reação catalisada por ela mesma (Breddam, 1991).

Na reação do tipo enzima-inibidor, as duas constantes cinéticas envolvidas são “k on”, que é a constante de associação ou formação do complexo EI e “k off”, que é a constante de dissociação do complexo EI. A formação desse complexo é muito estável e ocorre rapidamente (k_1 on) e a sua dissociação ocorre de forma muito lenta (k_1 off). Em consequência da dissociação do complexo, tanto a enzima (E) como o inibidor (I), podem se regenerar na reação regida pela constante “ k_1 off”; ou ainda, pode ocorrer regeneração da enzima e geração de um inibidor modificado (I^*) na reação, cuja constante de dissociação é denominada (k_2 off). Uma inibição eficiente apresenta altos valores de “k on”, ou seja, há rapidez na formação do complexo EI e baixos valores de “k off”, o que significa lentidão na dissociação do complexo EI (Bode & Huber, 1991).

Aplicação dos Inibidores de Proteinases

Há um interesse muito grande no possível uso de inibidores vegetais, que atuam sobre proteinases, no tratamento de uma gama de distúrbios metabólicos associados às enzimas proteolíticas, por exemplo, pancreatites, efizemas, alergias, inflamação, hipertensão e certos cânceres (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 & 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. O inibidor de (α -amilase de trigo é usado em exames laboratoriais para diagnosticar hiperamilasemia (Kennedy *et al.*, 1984).

Mecanismos Fisiológicos Controlados por Inibidores de Serinoproteinases

Conforme foi mencionado anteriormente, o controle da maioria dos processos fisiológicos, como digestão, coagulação sanguínea e fibrinólise é realizado, basicamente, através do mecanismo de ativação de zimogênios ou pela ação de inibidores específicos.

- **Digestão:** as proteínas da dieta devem ser absorvidas sob a forma de aminoácidos e para que isso ocorra, as proteínas devem ser hidrolisadas por enzimas proteolíticas, como a tripsina e a quimotripsina, enzimas digestivas encontradas no trato intestinal. Essas enzimas, sob a forma ativa, apresentam alto grau de especificidade e hidrolisam as proteínas em determinados resíduos de aminoácidos de acordo com sua especificidade (Sleisenger & Kim, 1979). A tripsina e a quimotripsina são enzimas muito semelhantes sob o ponto de vista estrutural, porém diferem quanto à especificidade por substratos. Enquanto a tripsina tem especificidade por aminoácidos básicos (lisina ou arginina), a quimotripsina hidrolisa preferencialmente os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, que contêm anéis aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptofano) (Hedstrom *et al.*, 1992; Corey & Craik, 1993).

A ativação do zimogênio depende da disponibilidade da forma ativa da enzima. No caso de ativação do quimotripsinogênio e do tripsinogênio, a formação de quimotripsina e tripsina decorre da hidrólise de apenas uma ligação peptídica. Essa ativação é irreversível e um mecanismo de controle da atividade dessas enzimas é a ação dos inibidores de proteinases (Stroud *et al.*, 1977).

- **Coagulação sanguínea:** a hemostasia, manutenção do fluxo sanguíneo normal, é um processo que depende do equilíbrio entre fatores de coagulação, inibidores da coagulação e de componentes do sistema fibrinolítico (Griffin, 1995). Desse modo, quando ocorre alguma alteração no organismo, que provoque o sangramento, são acionados dois processos de emergência, a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea (Devlin, 1992).

A coagulação sanguínea envolve uma série de reações enzimáticas, encadeadas entre si, que resulta na formação do coágulo, que por ser insolúvel, oblitera as lesões

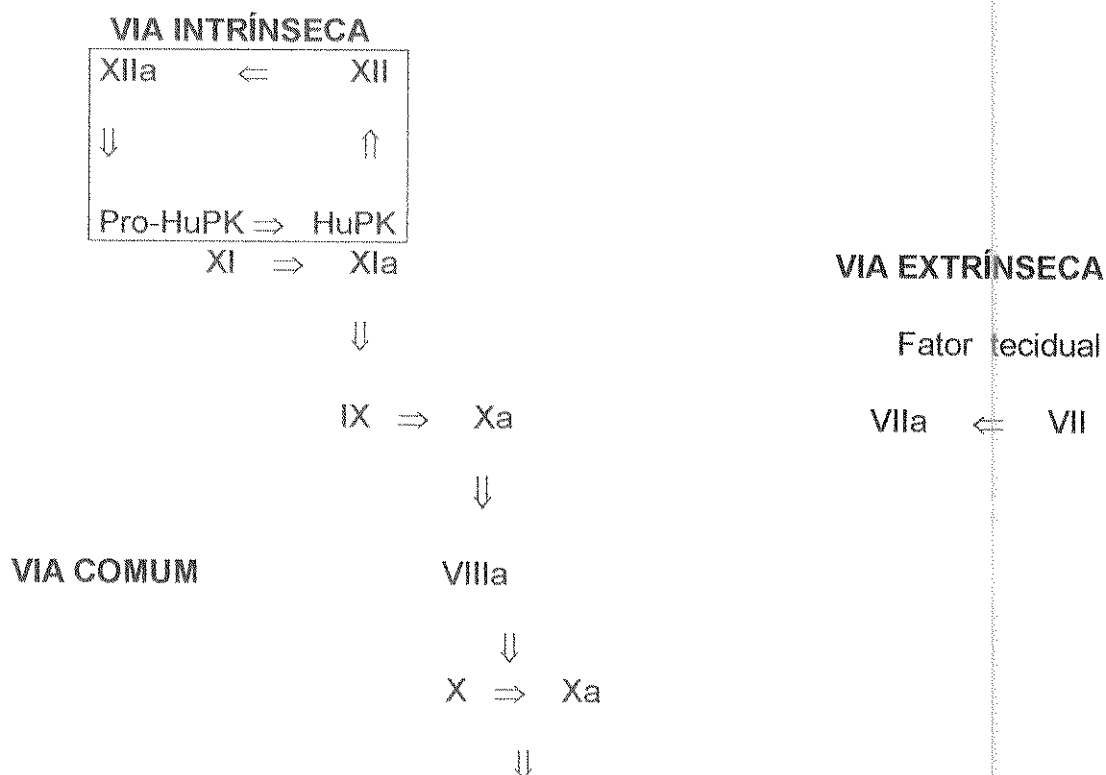
vasculares e estanca o sangramento. Após desempenhar sua função, o coágulo é dissolvido graças à sequência de eventos que constituem a fibrinólise, fazendo com que o fluxo sanguíneo se restabeleça no leito vascular.

A formação do coágulo de fibrina é um modelo de proteólise limitada, no qual um grande número de proteínas plasmáticas inativas é convertido sequencialmente em enzimas ativas. Essas reações se destinam à geração da fibrina, uma proteína insolúvel (Davie, 1995).

A maioria das proteínas, inclusive aquelas desprovidas de atividade catalítica, que participam da cascata da coagulação sanguínea, é representada por serinoproteinases.

O mecanismo de ativação em cascata foi proposto por Ratnoff e Davie em 1962 e atualmente já é bem esclarecido. Muitas proteínas e cofatores envolvidos nesse processo tiveram suas estruturas determinadas, principalmente devido às técnicas de biologia molecular (Halkier, 1991).

A coagulação sanguínea é composta por três vias: a via intrínseca, a via extrínseca e a via comum. É da ação dessas três vias que se forma o coágulo de fibrina (Davie *et al.*, 1991). As diferentes vias da cascata da coagulação estão esquematicamente representadas na figura 1.



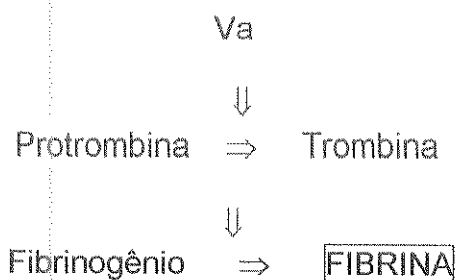


Figura 1. Representação esquemática das vias intrínseca, extrínseca e comum da cascata da coagulação sanguínea.

A via extrínseca se realiza às custas de um fator tecidual, encontrado em todos os tecidos, principalmente nos pulmões, cérebro e placenta. É liberado pela lesão dos tecidos e os componentes ativos são lipoproteínas. O fator tecidual interage com os fatores VII e X e juntamente com cálcio e fosfolípidos forma o ativador extrínseco da protrombina. Pela ativação da protrombina forma-se a trombina que, por sua vez, transforma o fibrinogênio em fibrina (Morrissey *et al.*, 1997).

A fase intrínseca da coagulação é também chamada plasmática ou fase de contato pois, ela requer o contato de parte dos fatores da coagulação com uma superfície negativamente carregada para a ativação dos zimogênios, e além disso há interferência de fatores coagulantes e anticoagulantes, que circulam no plasma (Schmaier, 1997). Compõem esta via o cininogênio de alto peso molecular (HMW-Kgn), a procalicreína plasmática (Pro-HuPK) e o fator XII. A procalicreína plasmática circula no plasma complexada com o HMW-Kgn, sendo, portanto, a proteína precursora da calicreína plasmática (HuPK), uma serinoproteinase (Lin *et al.*, 1996). A transformação da Pro-HuPK à forma ativa é desencadeada pelo fator XIIa, que ao hidrolisar a ligação peptídica Arg₃₇₁-Ile₃₇₂, libera a HuPK ativa (Herwald, 1996). A principal função da HuPK é a ativação do fator XII a fator XIIa. A cadeia leve, porção que contém o domínio catalítico da enzima, é homóloga ao domínio catalítico de outras serinoproteinases.

O fator X é uma proteína fundamental na cascata da coagulação, pois sua forma ativa (fator Xa) desencadeia a via comum da coagulação. A sua ativação pode ocorrer tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca (Halkier, 1991). O fator Xa, na presença de fator Va, fosfolípidos e Ca₂₊ promove a conversão da protrombina em trombina, a qual converte o fibrinogênio circulante solúvel no coágulo de fibrina insolúvel (Bode *et al.*, 1997; Deguchi *et al.*, 1997).

O processo de coagulação pode ser regulado através de uma série de mecanismos, porém a inibição das proteinases envolvidas é o meio mais eficiente para esse controle (Colman *et al.*, 1982). Entre estes inibidores, destacam-se o inibidor de fator tecidual (TFPI), a antitrombina III, (α -1-inibidor de proteinase, (α -2-macroglobulina e o C1-inibidor, que exercem importante papel na regulação da cascata (Davie, 1995).

- **Fibrinólise:** este processo consiste na destruição ou lise do coágulo de fibrina e vem sendo estudado desde 1889. Trata-se de um fenômeno proteolítico (Verstraete, 1995). A principal enzima deste processo é a plasmina, uma serinoproteinase do tipo tripsina que tem propriedade de degradar a fibrina formada no processo da coagulação (Takada *et al.* 1994). Desta forma, a fibrinólise precisa ser controlada pela ação de inibidores que podem bloquear direta ou indiretamente a plasmina (Takada *et al.*, 1994).

Papel dos Inibidores nas Sementes

- **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). Kirsi & Mikoka (1971), demonstraram que a presença de inibidores de tripsina na cevada e alface, respectivamente, diminuíram em concentração nos cotilédones e aumentaram nos brotos durante a germinação. 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).

- **Agentes de defesa de plantas:** Lipke *et al.* (1954), iniciaram os estudos dos inibidores sobre a dieta de insetos e encontraram a inibição do crescimento de larvas de *Triboleum*. Devido a 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 serinoproteinases no trato digestivo e/ou secreções de herbívoros, patógenos e pragas (Bowles, 1990).

O acúmulo de inibidores do tipo batata I e II em tomates (Plunkett *et al.*, 1982; Bishop *et al.*, 1984) e alfafa (Brown *et al.*, 1985), nos locais 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, detectaram 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 fator indutor de inibidor de proteinase (PIIF) de folhas de plantas jovens de tomate. Entretanto, o extrato obtido a partir do fungo *Agaricus campestris* mostrou-se mais efetivo, exibindo cerca de 20 vezes mais da atividade semelhante ao PIIF encontrado em folhas de tomate (Richardson, 1977). Os inibidores de batata também são efetivos contra o crescimento e a atividade proteolítica de microrganismos isolados de tubérculos de batata deteriorada (Senser *et al.*, 1974) e contra proteases exógenas de *Fusarium solani* (Mosolov *et al.*, 1976).

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.

Após ter sido estabelecido que algumas plantas produzem inibidores de proteinases em resposta ao ataque de herbívoros, muitos pesquisadores investigaram os efeitos desses inibidores com relação à aptidão ao inseto herbívoro. Resultados de experimentos "in vitro", com extrato de intestino de insetos e inibidores de proteinases purificados, indicaram que muitos desses inibidores seriam efetivos quando incorporados na dieta de insetos ou quando expressados nos insetos da planta hospedeira. Entretanto, resultados "in vivo" frequentemente não correspondem a esta expectativa. Há muitos fatores que merecem consideração e dentre estes destacam-se a concentração de inibidores, o valor da constante de interação com a protease, a estabilidade do inibidor no intestino do inseto, a presença de um complemento de inibidores para inibir todas as proteases do intestino e a habilidade dos insetos de se adaptarem à inibição da protease pela modulação da expressão do gene da protease. Os inibidores atuam por causar deficiência de aminoácidos (Broadway and Duffey,

1986b, 1988; Markwick *et al.*, 1995). Além disso, numerosos compostos fitoquímicos presentes ou induzidos em plantas têm o potencial de alterar a toxicidade dos inibidores de proteinases em insetos (Broadway and Duffey, 1988; Felton *et al.*, 1989).

Orozco-Cardenas *et al.* (1993), demonstraram que plantas de tomate transgênicas reduziram sua resistência contra as larvas de *Manduca sexta*. Estas plantas transgênicas não induziram a síntese de inibidores de proteinases após 60 dias de alimentação da larva.

As pragas encontraram diversas maneiras de evitar os efeitos negativos dessas proteínas de defesa em suas plantas hospedeiras. Estas incluem o uso de proteases para as quais a planta não tem inibidores, a degradação proteolítica dos inibidores e a ocorrência de mutações, conferindo às proteases dos insetos maior resistência, sem a perda da sua atividade catalítica (Jongsma & Bolter, 1997).

- **Reguladores de proteínas endógenas:** a maioria das endopeptidases de plantas parece ser enzimas do tipo cisteinoproteinases, embora haja um grande número de endopeptidases que não possui grupo sulfidril para atividade catalítica. As plantas parecem utilizar principalmente cisteinoproteinases para degradar proteínas, enquanto os animais e microorganismos utilizam serinoproteinases. O fato de as plantas utilizarem cisteinoproteinases, talvez esteja relacionado com o alto teor de inibidores de serinoproteinases presentes nessas plantas. Contudo, algumas plantas parecem ter enzimas do tipo serinoproteinases e proteinases ácidas (Ryan & Walker-Simmons, 1981). Várias endopeptidases que podem ser do tipo serinoproteinases têm sido encontradas em folhas de *Phaseolus vulgaris*, *Avena sativa* e vários outros vegetais, principalmente leguminosas e gramíneas (Larkins, 1981).

Durante a germinação das sementes de alface, foi comprovado que houve um aumento na atividade enzimática e que a concentração de inibidor diminuiu. Isso sugeriu que a enzima estava presente numa forma ativa, num complexo com inibidor, ou a enzima foi ativada a partir de um precursor, que bloqueou o inibidor à 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 das sementes por formar complexos inativos tripsina-inibidor (Poerio *et al.*, 1989).

Os inibidores extraídos de sementes que podem controlar enzimas endógenas tais como proteinases e α -amilases, prevenindo assim, a hidrólise prematura de reservas de

materiais, têm aumentado nas últimas décadas. Segundo Richardson (1991), há evidências de que em cereais, existem inúmeros inibidores de α -amilases endógenas que são responsáveis pela mobilização do amido durante a germinação.

Estudos apresentados por Baumgartner & Chrispeels (1976), sugerem que em sementes de *Vigna radiata*, há um inibidor de proteinase endógena, cuja finalidade é proteger as proteínas citoplasmáticas contra digestão. Somente uns poucos inibidores são conhecidos que inibem proteinases endógenas do tipo tripsina de sementes (Richardson, 1991).

Família Leguminosae

A família Leguminosae compreende 650 gêneros e aproximadamente 18.000 espécies. Esta família compreende plantas cuja morfologia é bastante variada, englobando desde árvores de grande porte até arbustos, ervas e trepadeiras. A principal característica desta família são frutos que quando secos, abrem-se por fendas para liberarem as sementes. Entre as leguminosas destacam-se algumas espécies economicamente importantes, provendo uma ampla variedade de fontes de alimento para o homem (soja, feijão, amendoim, ervilha) e para o gado (alfafa), além de muitas espécies serem utilizadas em projetos de reflorestamento. A família Leguminosae é subdividida em três importantes subfamílias: Mimosoideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae (Heywood, 1971).

Delonix regia

O gênero *Delonix* Raf. consiste de 11 espécies, 9 das quais são endêmicas de Madagascar.

A espécie *Delonix regia* pertence à família Leguminosae e subfamília Caesalpinioideae. É cultivada no leste e norte de Madagascar e em muitos países tropicais. As espécies do gênero *Delonix* são plantas atrativas, com hábitos e flores decorativas e são frequentemente plantadas em vilas e cidades (figura 2). As sementes da maioria das espécies de *Delonix* são largas, lineares-oblongas e um pouco achatadas. *Delonix regia* tem sementes em forma de tiras com numerosas sementes (figura 3). Várias espécies produzem resina transparente, quando submetidas a injúrias, que pode se acumular formando tubérculos facilmente destacadas da árvore. Apesar da resina, quando seca, ser dura e semelhante a verniz, ela é solúvel em água e é usada como cola. As sementes de algumas espécies são trituradas cruas e ingeridas como refeição, em Madagascar (Puy *et al.*, 1995).

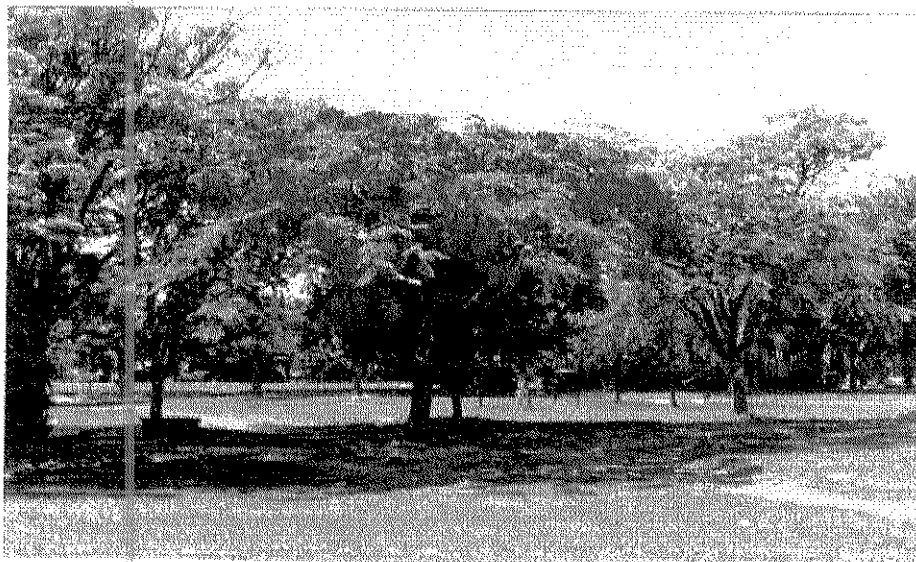


Figura 2. Exemplar adulto de *Delonix regia*.

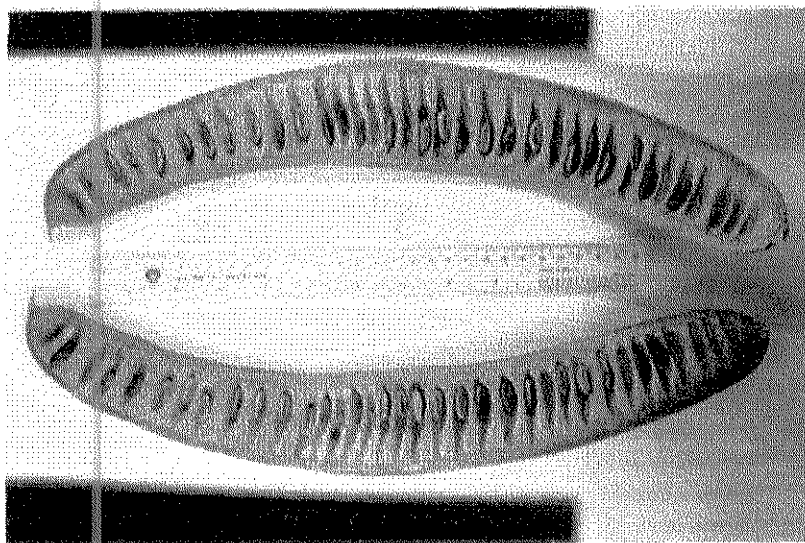


Figura 3. Amostra do fruto e sementes de *Delonix regia*.

OBJETIVOS

- ◆ Isolar, purificar e caracterizar parcialmente o inibidor a partir da farinha de sementes inteiras de *Delonix regia*;
- ◆ Determinar as constantes de inibição em relação às serinoproteinases digestivas (quimotripsina e tripsina bovina e porcina);
- ◆ Determinar as constantes de inibição em relação às serinoproteinases envolvidas na coagulação sanguínea (HuPK, Fator Xa e plasmina);
- ◆ Determinar a massa molecular aparente do inibidor através de eletroforese em gel de poliacrilamida;
- ◆ Determinar o modelo estrutural do inibidor, através de estudos cristalográficos.

MATERIAIS

Material Vegetal

No presente trabalho foram utilizadas sementes maduras de *Delonix regia* (Leguminosae-Caesalpinioideae), que foram fornecidas pelo Instituto Florestal do Estado de São Paulo, São Paulo.

Enzimas

As enzimas utilizadas para os experimentos foram:

Tripsina bovina e porcina (EC 3.4.21.4) e quimotripsina bovina (EC 3.4.21.1), adquiridas da Sigma;

A calicreína plasmática (EC 3.4.21.34) e Fator Xa (EC 3.4.21.6) humanos foram preparados no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo, segundo procedimentos descritos por Oliva *et al.* (1982) e Lopes (1992), respectivamente.

A plasmina humana (EC 3.4.21.7) foi adquirida da Chromogenix.

Substratos

Os substratos colorimétricos utilizados neste trabalho foram adquiridos da Sigma, exceto o S-2302, da Chromogenix.

Resinas

As resinas de troca iônica DEAE Sephadex A-50 e Sephadex G-75, foram adquiridas da Pharmacia Fine Chemical;

A coluna de troca iônica DEAE 5PW (HPLC) foi adquirida da Waters.

Reagentes para eletroforese

Os padrões de massas moleculares fosforilase b (94 kDa), albumina bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20 kDa) e α -lactalbumina (14 kDa), foram obtidos da Pharmacia. As demais substâncias como dodecil sulfato de sódio (SDS), Coomassie Brilliant Blue R-250, acrilamida, N',N', metilenobisacrilamida, TEMED e persulfato de amônio, foram adquiridos da Bio-Rad Laboratories. Os demais reagentes utilizados foram de grau HPLC.

MÉTODOS

1. DOSAGEM ENZIMÁTICA

Hidrólise de substratos cromogênicos

Os substratos sintéticos, derivados da p-nitroanilida, foram utilizados para dosagem de tripsina, quimotripsina, fator Xa humano, calicreína plasmática humana e plasmina humana. Estes substratos, peptídeos derivados de p-nitroanilida, têm sido amplamente utilizados, principalmente pela alta sensibilidade, através de medida fotométrica em 405 nm da p-nitroanilida liberada após a hidrólise enzimática (Erlanger *et al.*, 1961). Os ensaios foram realizados com excesso de substrato e o produto de hidrólise (p-nitroanilida) foi acompanhado por absorvância em 405 nm.

Determinação das concentrações de tripsina e quimotripsina ativas

As concentrações de tripsina e quimotripsina ativas, usadas nos ensaios, foram determinadas pela titulação fotométrica dos sítios ativos com o substrato NPGB, de acordo com Chase & Shaw (1970) e Sampaio *et al.* (1984). Para um volume final de 1,005 ml, a mistura de incubação continha 54 mM de tampão barbital (pH 8,3), 0,046 mM do substrato NPGB, 99,5 µg de tripsina e 199 µg de quimotripsina, ambas diluídas em 1mM de HCl. A mistura acima foi deixada em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente, ao fim dos quais, os títulos dos sítios ativos da tripsina e da quimotripsina foram acompanhados através da hidrólise do substrato, estimada pela leitura em 410 nm do p-nitrofenol liberado.

2. PURIFICAÇÃO DO INIBIDOR A PARTIR DAS SEMENTES DE *Delonix regia*

Extração salina

As sementes inteiras foram trituradas em um moinho analítico até a obtenção de um material pulverizado. A farinha das sementes (70g) foi homogeneizada com solução de NaCl 10% 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 a 3000 x g, por 20 minutos a 4°C, sendo o precipitado descartado e o sobrenadante foi o material utilizado nas etapas posteriores de purificação do inibidor.

Precipitação das proteínas por acetona 80%

A precipitação das proteínas extraídas em NaCl 10%, foi realizada por adição lenta de acetona ao sobrenadante obtido na etapa anterior, sob agitação, em câmara fria (4°C), até a concentração final de 80%. Após um período de decantação (30 minutos), parte da acetona foi retirada e a fração restante foi centrifugada a 3000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado protéico foi espalhado em placas de Petri e seco à temperatura ambiente.

Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A-50

A resina foi preparada conforme instruções do fabricante (Pharmacia), sendo previamente entumescida, equilibrada com 0,05M de tampão inicial Tris-HCl pH 8,0 e empacotada em coluna de vidro (27 x 1,8 cm).

O material resultante da precipitação acetônica foi ressuspendido em água, clarificado por centrifugação a 3000 x g por 15 minutos.

A eluição foi realizada com gradiente linear (0,05M de tampão Tris-HCl /0-0,5M de NaCl pH 8,0) com um fluxo de 30 ml por hora, sendo coletadas frações de 3 ml.

Nos eluatos, foram determinadas a concentração de proteínas (A280nm) e a atividade inibitória das frações, utilizando-se a tripsina bovina como enzima padrão, de acordo com o procedimento descrito no item 4. As frações com atividade biológica foram reunidas em um "pool", dializadas e liofilizadas.

Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75

O inibidor obtido na etapa anterior foi submetido a uma coluna de gel filtração em Sephadex G-75 (102 x 1,9 cm). A coluna foi equilibrada com 0,05M de tampão Tris-HCl/0,15M de NaCl, pH 8,0, com fluxo de 12 ml/h. A concentração de proteínas e a atividade inibitória foram determinadas como descrito anteriormente.

Cromatografia de troca iônica em DEAE 5PW

A fração com atividade inibitória (1mg) proveniente da etapa anterior foi aplicada em uma coluna de DEAE 5PW (7,5 x 75 mm), acoplada ao sistema de HPLC. As proteínas foram

eluídas com gradiente linear descontínuo (20 mM de Tris-HCl /0-0,5M de NaCl, pH 8,0), com fluxo de 1 ml/min. O monitoramento das proteínas e a atividade biológica das frações foi realizado conforme descrito acima.

3. EXTRAÇÃO ÁCIDA DO INIBIDOR DE *Delonix regia*

O inibidor de *Delonix regia* foi também extraído em baixo pH, com ácido sulfúrico, como descrito por Weder, 1978. Esta metodologia de extração foi utilizada com a finalidade de calcular a quantidade de tripsina que foi inibida por grama de pó de semente. A farinha das sementes (5g) foram colocadas em solução 0,25N de H_2SO_4 , e mantidas sob agitação por 1 hora. A solução foi centrifugada a 3000 x g durante 20 minutos. O sobrenadante (70ml), foi ajustado para o pH 7,6 com NaOH. O volume foi completado para 100 ml com 0,2M de tampão Tris-HCl e 66mM de $CaCl_2$, pH 7,6.

Determinação da atividade da tripsina

Foi feita uma curva de calibração para esta enzima que foi previamente titulada, como já foi mencionado anteriormente. Para um volume final de 4,0 ml, a mistura de pré-incubação continha 25 μ g de tripsina (previamente dissolvida em 1mM de HCl) e diferentes concentrações de tampão Tris/HCl (132 a 142 mM) mais $CaCl_2$ (43 a 47 mM), pH 7,6. Após 10 minutos de pré-incubação a 30°C, foi acrescentada uma solução de 2,5 mM do substrato L-BAPNA, previamente dissolvido em DMSO. A incubação prosseguiu por mais 10 minutos a 30°C, sendo interrompida com ácido acético 30% (v/v), no mesmo intervalo e ordem em que se acrescentou o L-BAPNA. A absorbância foi monitorada a 405 nm.

Determinação da atividade do inibidor sobre tripsina

A determinação da quantidade de inibidor nos extratos foi feita pela inibição da tripsina medida sobre o L-BAPNA. Para um volume final de 4,0 ml, a mistura de pré-incubação continha 25 μ g de tripsina, diferentes concentrações do inibidor em solução e diferentes concentrações de tampão Tris/HCl (132 a 142 mM) mais $CaCl_2$ (43 a 47 mM), pH 7,6. Após a pré incubação durante 10 minutos a 30°C, a reação foi iniciada pela adição de 2,5 mM de substrato (L-BAPNA), em intervalos regulares cronometrados. Incubou-se por 10 minutos a 30°C, interrompendo-se a reação com ácido acético 30% (v/v). A absorbância foi monitorada a 405 nm.

4. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DO INIBIDOR DE *Delonix regia*

Medida da inibição sobre tripsina bovina e porcina

Para um volume final de 2,0 ml, a mistura de pré-incubação continha 12,5 mM de tampão Tris/HCl pH 8,0, 50 µg de tripsina (dissolvida em 1 mM de HCl) e diferentes concentrações do inibidor. A pré-incubação prosseguiu durante 10 minutos a 37°C. Decorrido o tempo descrito, 0,5 mM do substrato cromogênico DL-BAPNA foi adicionado e a incubação prosseguiu por mais 30 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético 30% (v/v) e a hidrólise do substrato pela enzima foi acompanhada fotometricamente a 405 nm. O cálculo da atividade inibitória foi feito pela determinação da atividade residual da tripsina no ensaio.

Medida da inibição sobre quimotripsina

Para um volume final de 2,0 ml, a mistura de pré-incubação continha 12,5 mM de tampão Tris/HCl pH 8,0, 2,1 µM de quimotripsina (dissolvida em 1 mM de HCl) e diferentes concentrações do inibidor. A pré-incubação prosseguiu durante 10 minutos a 37°C. Em seguida 0,25 mM do substrato cromogênico BTPNA foram adicionados e, decorridos 30 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de ácido acético 30% (v/v). A hidrólise do substrato pela enzima foi acompanhada fotometricamente a 405 nm. O cálculo da atividade inibitória foi feito pela determinação da atividade residual da quimotripsina no ensaio, comparando os resultados obtidos na ausência e na presença do inibidor.

Medida da inibição sobre caliceína plasmática humana

No ensaio de inibição da caliceína plasmática humana, utilizou-se como substrato o composto S-2302. Para um volume final de 2,0 ml, o meio de pré-incubação continha 12,5 mM de tampão Tris/HCl pH 8,0, 1 µg de HuPK e diferentes concentrações do inibidor. A pré-incubação prosseguiu durante 10 minutos a 37°C.

Decorrido o tempo de pré-incubação, 1 mM do substrato foi adicionado e a incubação prosseguiu por mais 20 minutos. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético 30% (v/v). O cálculo da atividade inibitória foi realizado pela determinação da hidrólise do substrato cromogênico e atividade residual da HuPK no ensaio, comparando-se a atividade enzimática na presença e na ausência do inibidor. A absorbância foi monitorada a 405 nm.

Medida da inibição sobre plasmina humana

Para a dosagem da plasmina humana utilizou-se o substrato conhecido como S-2251. Para um volume final de 2,0 ml, o meio de pré-incubação continha 12,5 mM de tampão Tris/HCl pH 8,0, 0,125 g de plasmina e diferentes concentrações do inibidor. A pré-incubação prosseguiu durante 10 minutos a 37°C.

Decorrido o tempo de pré-incubação, 1,5 mM de S-2251 foi adicionado e a incubação prosseguiu por mais 60 minutos. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético 30% (v/v). Neste ensaio foi acompanhada a hidrólise do substrato, comparando-se a atividade enzimática na ausência e na presença do inibidor. A absorbância foi monitorada a 405 nm.

Medida da inibição sobre o Fator Xa humano

A dosagem do Fator Xa humano (FXa) foi precedida pela ativação da pró-enzima, seguindo o método descrito por Lopes (1992). O substrato para a dosagem foi o composto S-2222. Para um volume final de 2,0 ml, a mistura de pré-incubação continha 12,5 mM de tampão Tris/HCl pH 8,0, 1nM de fator Xa e diferentes concentrações do inibidor. A pré-incubação prosseguiu durante 10 minutos a 37°C.

Após a pré-incubação de 10 minutos, 1,5 mM de S-2222 foram adicionados e a incubação prosseguiu por mais 60 minutos. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético 30% (v/v). O cálculo da atividade inibitória foi realizado pela determinação da atividade residual do FXa no ensaio, comparando-se a atividade enzimática na presença e na ausência do inibidor. A absorbância foi monitorada a 405 nm.

5. DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE INIBIÇÃO

As constantes de inibição das serinoproteinases empregadas no estudo do inibidor de *Delonix regia*, foram calculadas assumindo-se o mecanismo de inibição do tipo "slow tight-binding" (Morrison, 1982). Os dados foram analisados no programa de computador Enzifitter.

6. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Durante os procedimentos cromatográficos, as concentrações relativas de proteínas dos eluatos foram estimadas pela medida da absorbância a 280 nm, usando um espectrofotômetro Shimadzu Modelo UV 1201.

A quantificação das frações protéicas foi feita de acordo com o método descrito por Lowry (Lowry *et al.*, 1951; Peterson, 1979). Uma amostra (200 µl de solução de proteína convenientemente diluída foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente com 1 ml do reagente cupro-alcálico (solução C). A solução C é constituída de 2% de carbonato de sódio (p/v) em 0,1N de NaOH (solução A), 1% de sulfato de cobre (p/v) em H₂O (solução B1) e 2% de tartarato de sódio e potássio (p/v) em H₂O (solução B2), na proporção de 100:1:1 (v/v), respectivamente.

À mistura acima adicionou-se 50 µl do reagente Folin-fenol Ciocalteau (Merck), deixou-se em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente e ao fim dos quais foi determinada a absorbância a 660 nm. A concentração de proteína foi determinada usando uma curva padrão de albumina sérica bovina (Fraction V, Sigma, Co.) com concentrações variando de 0 a 400 (g/ml).

7. ELETROFORESE EM SDS-PAGE

A análise eletroforética das proteínas foi feita segundo Laemmli (1970).

O gel de poliácridamida foi preparado sob um gradiente 10 - 20% (proporção 30:0,8 de acrilamida:bisacrilamida). O gel de corrida foi preparado em 0,4M de tampão Tris-HCl pH 8,8, contendo, 0,2% de SDS, 0,025% de PSA (100mg/mL) e 0,05% de TEMED, em volume final de 8ml para cada gel. Após a polimerização do gel de corrida, foi preparado o gel superior para a aplicação das amostras, usando-se 5% de acrilamida em 0,1 M de tampão Tris-HCl, pH 6,8, contendo 0,5% de SDS, 0,025% de PSA (100mg/mL) e 0,1% de TEMED, em um volume final de 2ml. A eletroforese em SDS-PAGE, foi realizada em um sistema duplo de placas SE 250 Mighty Small (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA).

As amostras (10 a 50 µl) de uma solução de aproximadamente 1 mg de proteína por ml, foram dissolvidas em 0,08M de tampão Tris HCl pH 6,8, contendo 10% de glicerol, 0,02% de bromofenol e 2% de SDS. No caso das amostras reduzidas, foi empregado ditiotretol (100mg/ml) no mesmo tampão e em seguida as amostras foram aplicadas em volume

máximo de 40 µl. A corrida eletroforética foi desenvolvida em temperatura ambiente, em 0,18M/0,025M de tampão Glicina/Tris-HCl, pH 8,3, contendo 0,1% de SDS (m/v) com duração aproximada de 2 horas sob corrente de 30 mA.

Após a corrida, o gel foi retirado das placas e colocado em uma solução contendo 0,25% de Coomassie Blue R-250 em metanol, ácido acético e água (40:10:50, v/v), para coloração das proteínas. A descoloração do gel, para remoção do excesso de corante e visualização das bandas de proteínas, foi efetuada por lavagem na mistura de metanol, ácido acético e água (40:10:50, v/v).

8. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR APARENTE DO INIBIDOR

A massa molecular aparente do inibidor foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida, segundo método descrito por Laemmli (1970). Os padrões de massas moleculares utilizados foram: fosforilase b (94 kDa), albumina bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa) e α -lactalbumina (14 kDa).

9. CRISTALIZAÇÃO DO INIBIDOR DE *Delonix regia*

O DrTI foi cristalizado pelo método de suspensão de gotas e difusão a vapor a 18°C (McPherson, 1982). O inibidor foi dissolvido em 25 mM do tampão fosfato de potássio em concentração final de 22 mg/ml. Posteriormente, 10 µl desta solução foi misturada com igual quantidade de 7,5% de PEG 6000 em 12 mM do tampão fosfato de potássio, cujo pH variou entre 5,4 e 6,3. Após centrifugação (4000 x g), por 5 minutos, gotas de 18 µl da solução resultante foram equilibradas contra 1 ml num reservatório contendo 15% de PEG 6000 em 100 mM do tampão fosfato de potássio, pH 6,0.

Coleta e processamento dos dados

Os dados de raios-X, provenientes do cristal nativo único, foram coletados à temperatura ambiente. A cristalografia da proteína foi possível através de uma linha de Pfeixe direcional do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS), usando 345 mm de um detector na forma de placa e radiação monocromática de raio-X, utilizando a absorbância de

1,38 Å. Foram coletadas 96 oscilações de imagens com um ângulo de 1° e exposição de 30000 unidades de dose por imagem. Os dados foram processados nos programas DENZO e SCALEPACK (Otwinowski, 1993) e estendidos para uma resolução de 2,95 Å.

RESULTADOS

1. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DO INIBIDOR DE *Delonix regia*

Inibição da tripsina bovina e porcina

Após a extração salina (10%, p/v), foi feito o teste enzimático para detectar a presença do inibidor nas sementes de *Delonix regia*. Além da tripsina bovina, foi realizado o teste com outras enzimas que atuam no processo digestivo, como a tripsina porcina e a quimotripsina. Este ensaio enzimático, é utilizado como padrão para detectar a presença de inibidores nas sementes de diversas leguminosas. Uma vez constatada a atividade inibitória, foi realizada a segunda etapa de purificação do inibidor, que consistiu na precipitação das proteínas com acetona (80%, v/v).

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. O substrato utilizado foi o DL-BAPNA.

As figuras 4 e 5 mostram as curvas de inibição da tripsina bovina e tripsina porcina, respectivamente, na presença de quantidades crescentes do inibidor (DrTI). Após incubação por 30 minutos, em 12,5 mM do tampão Tris-HCl, pH 8,0, a 37°C, a atividade enzimática foi determinada pela hidrólise do substrato cromogênico DL-BAPNA, espectrofotometricamente com a finalidade de estimar a atividade residual da tripsina no ensaio e, conseqüentemente, a eficiência inibitória.

A figura 6 apresenta a curva de inibição da tripsina bovina pelo precipitado acetônico, comprovando que não houve perda da atividade biológica do inibidor após esta etapa.

A partir da extrapolação desta curva, para o ponto de intersecção com a abscissa, pôde ser calculada a concentração real do inibidor.

A quimotripsina não foi inibida pelo inibidor de *Delonix regia*.

Inibição da calicreína plasmática humana

A figura 7 mostra a curva de inibição da calicreína, incubada durante 10 minutos, com diferentes concentrações do inibidor em 0,1M de tampão Tris-HCl pH 8,0, a 37°C. O fator Xa humano e a plasmina, outras enzimas da coagulação sanguínea, não foram inibidas.

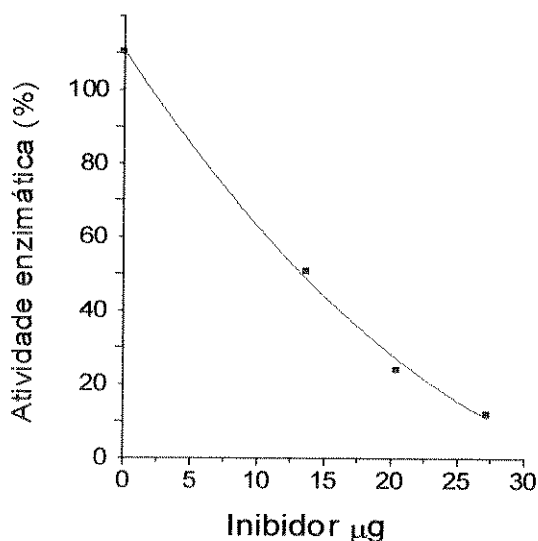


Figura 4. Curva de inibição da tripsina bovina pelo extrato salino de *Delonix regia*. A tripsina (50µg) foi pré-incubada com diferentes concentrações do inibidor, em 12,5 mM de tampão Tris-HCl, pH 8,0. A atividade residual da tripsina foi acompanhada pela hidrólise do substrato DL- BAPNA.

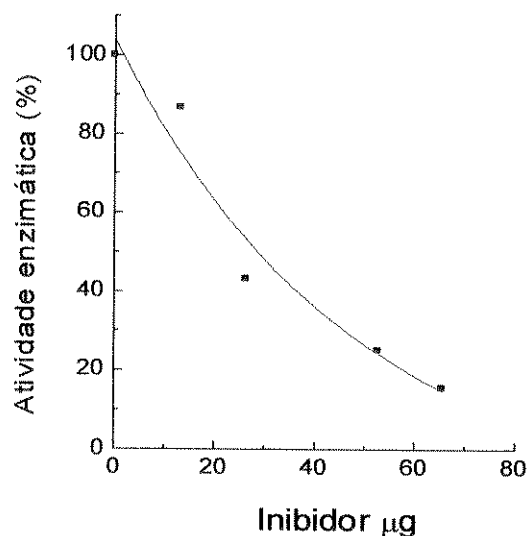


Figura 5. Curva de inibição da tripsina porcina pelo extrato salino de *Delonix regia*. A tripsina ((50µg) foi pré-incubada com diferentes concentrações do inibidor, em 12,5 mM de tampão Tris-HCl, pH 8,0. A atividade residual da tripsina foi acompanhada pela hidrólise do substrato DL- BAPNA.

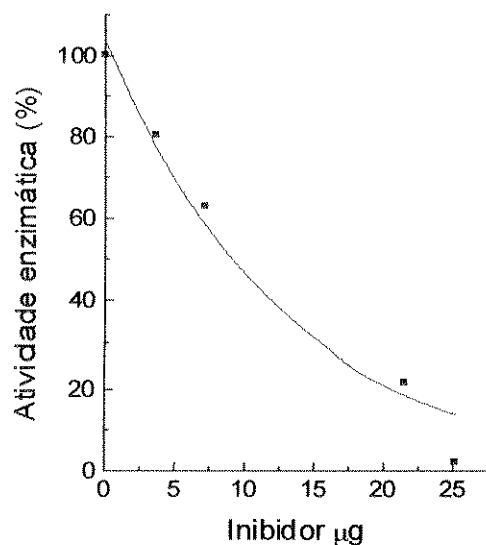


Figura 6. Curva de inibição da tripsina bovina pelo precipitado acetônico de *Delonix regia*. A tripsina (50μg) foi pré-incubada com diferentes concentrações do inibidor, em 12,5 mM de tampão Tris-HCl, pH 8,0. A atividade residual da tripsina foi acompanhada pela hidrólise do substrato DL- BAPNA.

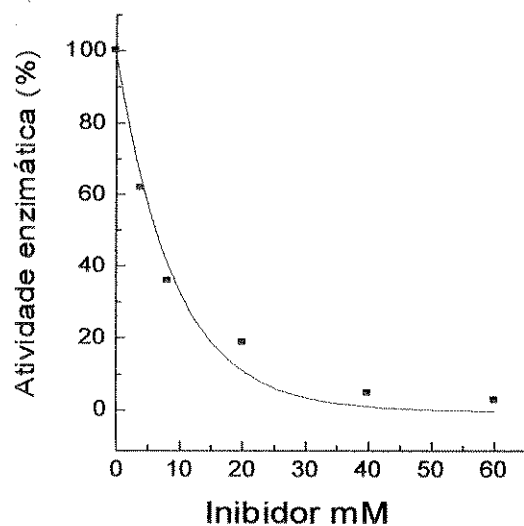


Figura 7. Curva de inibição da calicreína plasmática humana pelo DrTI. A enzima (1μg) foi pré-incubada durante 10 minutos, com diferentes concentrações do inibidor, em 12,5 mM de tampão Tris-HCl, pH 8,0. O cálculo da atividade inibitória foi realizado pela determinação da atividade residual da enzima na presença e na ausência do inibidor. O substrato utilizado foi o S-2302.

2. DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE INIBIÇÃO

Após obter as curvas para cada uma das enzimas acima, foi possível determinar as constantes de inibição de acordo com o procedimento de Morrison (1982) e adaptada ao programa de computador Enzfitter.

A tabela 2 apresenta os valores das constantes de inibição do inibidor na presença de enzimas do tipo serinoproteinases.

Tabela 2. Constantes de inibição do inibidor de *Delonix regia*.

ENZIMAS	K _i (M)
<i>Tripsina bovina</i>	$2,19 \times 10^{-8}$
<i>Tripsina porcina</i>	$4,53 \times 10^{-8}$
<i>Calicreína plasmática humana</i>	$5,25 \times 10^{-9}$
<i>Fator Xa</i>	n.i
<i>Plasmina</i>	n.i
<i>Quimotripsina</i>	n.i

n.i = ausência de inibição

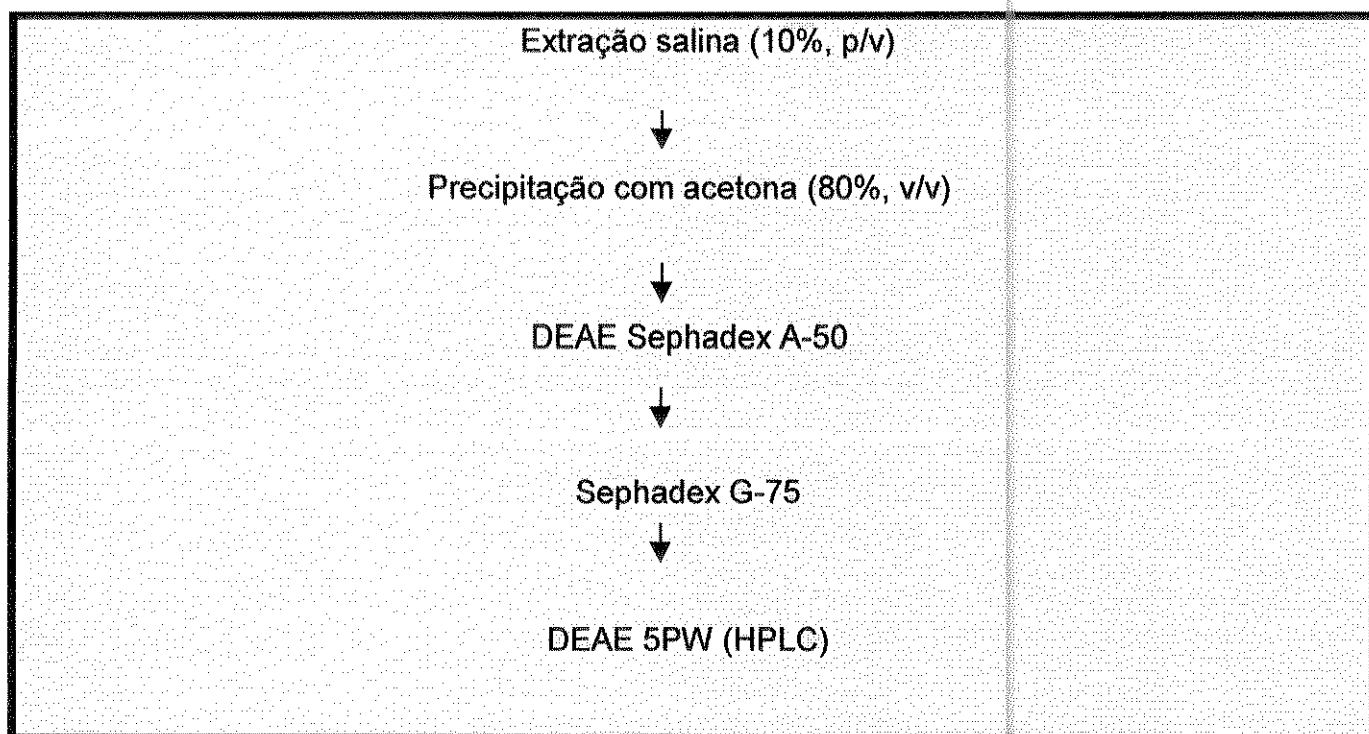
Considerando que o valor de K_i determina a afinidade entre a enzima e o inibidor, é possível verificar que não houve diferença com relação à afinidade do inibidor pela tripsina bovina e porcina, pois os valores de K_i para estas enzimas foram da mesma ordem de grandeza (10^{-8} M). A máxima inibição da atividade amidolítica observada com as preparações pancreáticas bovina e porcina foi de 98% e 75%, respectivamente.

A quimotripsina, outra serinoproteinase que atua no sistema digestivo, não foi inibida pelo DrTI, sugerindo que o sítio reativo deste inibidor pode ser reconhecido somente pela tripsina ou por uma enzima semelhante à tripsina.

A determinação do K_i foi feita também com algumas serinoproteinases que atuam na cascata da coagulação sanguínea. A plasmina e o Fator Xa, não foram inibidas pelo DrTI, entretanto, este inibidor mostrou maior afinidade pela calicreína plasmática humana, pois o valor de K_i para esta enzima foi menor ($5,25 \times 10^{-9}$ M). A atividade da calicreína plasmática humana foi reduzida em 97%, na presença do inibidor.

3. PURIFICAÇÃO DO INIBIDOR

O esquema abaixo mostra as etapas de purificação do inibidor extraído das sementes de *Delonix regia*.



Cromatografia de troca iônica em DEAE Sephadex A-50

Nesta cromatografia 10 ml (4,5 mg/ml) da fração protéica resultante da precipitação com acetona 80% (v/v), após dialisada e liofilizada, foi aplicada em uma coluna de troca iônica DEAE Sephadex A-50.

A figura 8 mostra o perfil cromatográfico, em que a fração com atividade biológica encontra-se no "pool A", o qual corresponde aos tubos 100-120. A eluição do inibidor ocorreu através de um gradiente linear de NaCl (0-0,5M).

A cromatografia de troca iônica foi empregada para purificar o inibidor e verificar a possível ocorrência de iso-inibidores nas preparações.

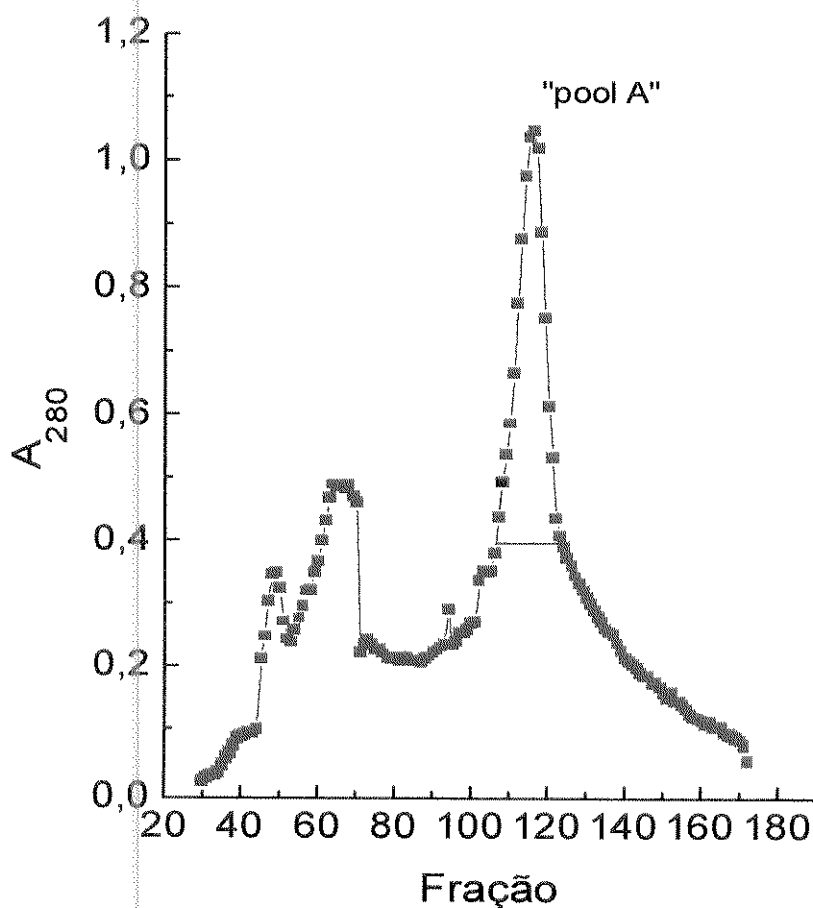


Figura 8. Cromatografia de troca iônica em DEAE Sephadex A-50. Amostra: 10 ml do inibidor proveniente da precipitação por acetona (4,5 mg/ml). Fluxo: 30 ml/h. Tampão de equilíbrio: 0,05M de Tris-HCl. Tampão de eluição: 0,05M de Tris-HCl / 0-0,5M de NaCl, pH 8,0. (-) fração com atividade inibitória.

Cromatografia de Exclusão Molecular em Sephadex G-75

Nesta segunda etapa de purificação, a fração ativa ("pool A"), proveniente da cromatografia de troca iônica (DEAE Sephadex A-50), após diálise e liofilização, foi submetida a uma cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-75). O perfil cromatográfico mostra a presença de uma porção principal ("pool B"), correspondente aos tubos 37-42. A fração com atividade inibitória está demarcada com uma linha na base do pico, como mostra a figura 9.

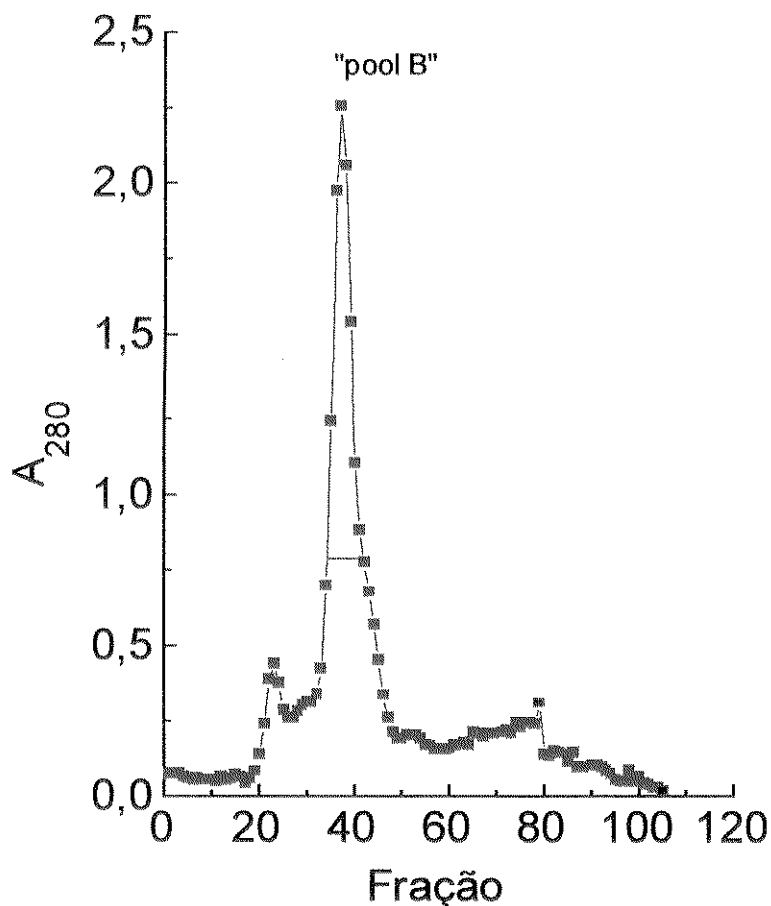


Figura 9. Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75. Amostra: 2,5 mg de inibidor proveniente da DEAE Sephadex A-50. Tampão de equilíbrio: 0,05M de Tris-HCl/0,15M de NaCl, pH 8,0. Fluxo: 12 ml/h. (-) fração com atividade inibitória.

Cromatografia de troca iônica em DEAE 5PW (HPLC)

A fração ativa proveniente da cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75 ("pool B"), foi submetida à outra cromatografia de troca iônica, com a finalidade de se obter o inibidor purificado e com atividade biológica. A fração com atividade inibitória foi eluída num pico principal, através de um gradiente linear com 0-0,5M de NaCl, sendo que a fração correspondente ao inibidor foi eluída no gradiente de 0,2 M de NaCl. Este resultado está apresentado na figura 10.

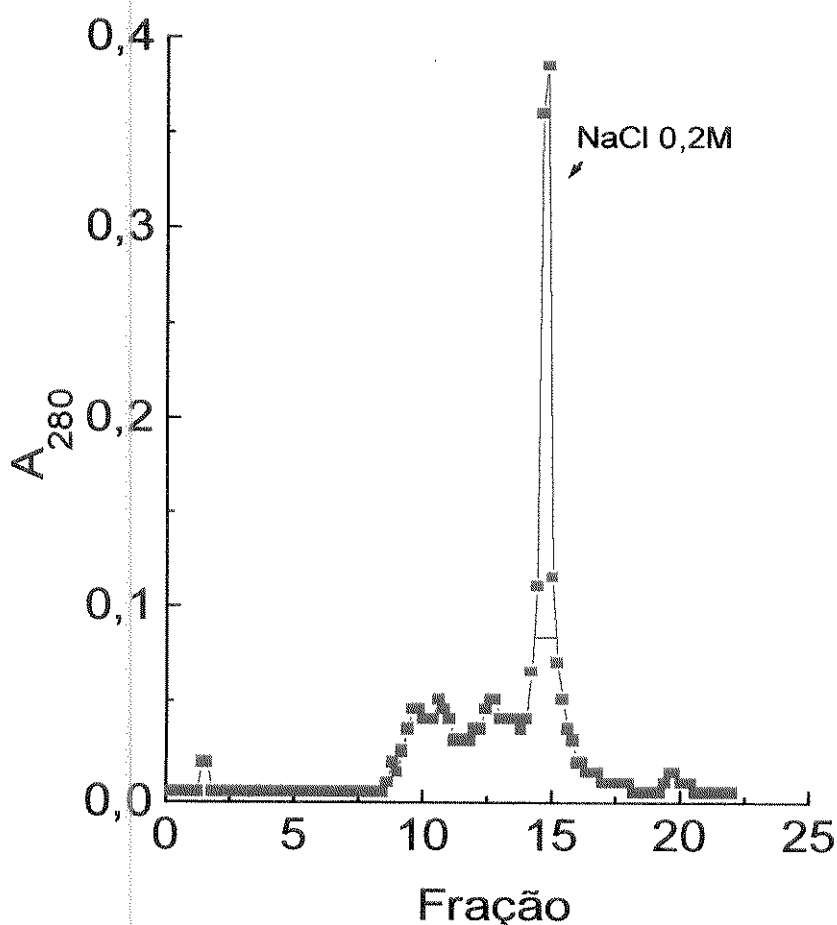


Figura 10. Cromatografia de troca iônica em DEAE 5PW, acoplada ao sistema de HPLC. Amostra: 1 mg de inibidor eluído da coluna de exclusão molecular. Tampão de equilíbrio: Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Tampão de eluição: 20 mM de Tris-HCl / 0-0,5M de NaCl, pH 8,0. Fluxo: 1ml/min. (-) fração com atividade inibitória.

Controle do rendimento de purificação do inibidor

As etapas de purificação do inibidor estão apresentadas na tabela 3. É possível verificar que a atividade específica do inibidor aumentou, conforme foram sendo realizadas as etapas de purificação, sendo de 0,05 no início e 2,3 no final. Este resultado é esperado, uma vez que indica o grau de pureza de uma proteína. Na última etapa de purificação (DEAE 5PW), o inibidor foi purificado cerca de 343 vezes e o rendimento foi de 3%.

Tabela 3. Purificação do inibidor de *Delonix regia*.

Etapas	Volume (ml)	Proteína Total^a (mg)	Atividade Total^b (U)	AE (U/mg)^c	Purificação (vezes)	Rendimento (%)
Extrato salino	520	1820	101,1	0,056	1	100
Precipitado acetônico	46	188,6	67,32	0,36	6	66
DEAE Sephadex A-50	81	86,83	43,97	0,51	9	43
Sephadex G-75	11,6	12,3	20,59	1,67	249	20
DEAE 5PW	10	1,3	3	2,3	343	3

^a Estimado por Lowry *et al.*, 1951;

^b (U) = unidade de inibidor;

^c (U/mg) = unidade de inibidor / mg de proteína;

4. ELETROFORESE EM SDS-PAGE

A figura 11, mostra um gel com as etapas iniciais de isolamento do DrTI, como a extração salina e o precipitado acetônico, onde ocorre a presença de maior número de proteínas, distribuídas em todas as faixas de massa molecular.

A figura 12 mostra as etapas de purificação do inibidor obtido em coluna de exclusão molecular (Sephadex G-75) e coluna de troca iônica (DEAE 5PW). O grau de pureza do inibidor é semelhante ao SBTI (inibidor de tripsina de soja), disponível comercialmente. Além disso é possível verificar que o inibidor apresenta uma cadeia polipeptídica única, mesmo em condições redutoras, na presença de DTT 0,1M.

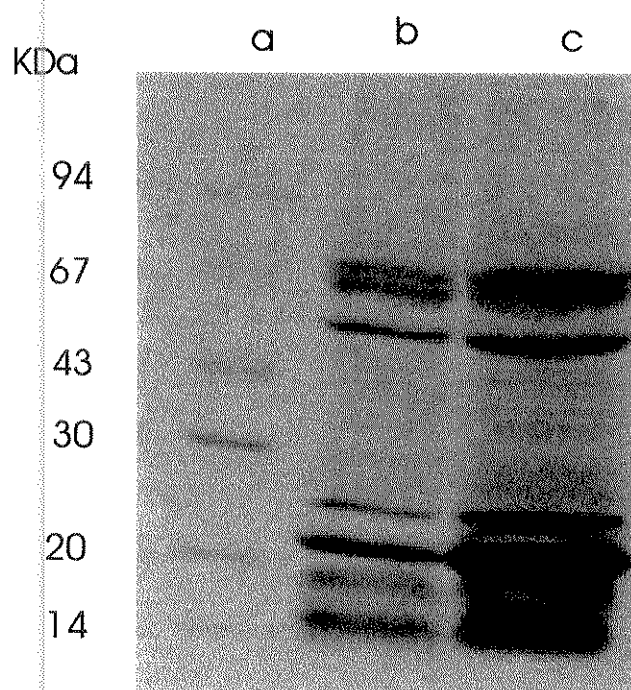


Figura 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida (10-20%), das etapas iniciais de isolamento do inibidor, na presença de SDS. Amostras: a: marcadores de massa molecular; b: extrato salino do DrTI 40 (μ g); c: precipitado acetônico do DrTI (40 μ g).

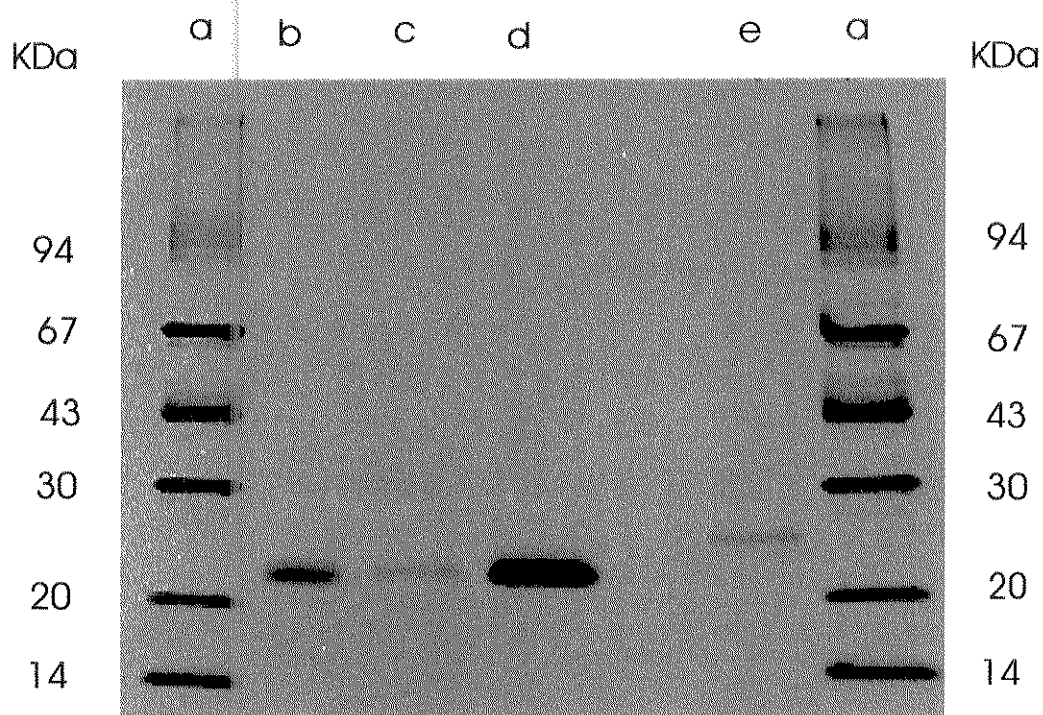


Figura 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida (10-20%), do inibidor purificado, na presença de SDS. Amostras: a: marcadores de massa molecular; b: inibidor eluído da Sephadex G-75; c e d: inibidor eluído da DEAE 5PW; e: inibidor da DEAE 5PW reduzido.

5. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR APARENTE DO INIBIDOR

A massa molecular aparente do inibidor também foi estimada através da eletroforese em gel de poliacrilamida, sendo o valor de aproximadamente 22 kDa, sugerindo que este inibidor pertence à família de inibidores vegetais do tipo Kunitz (figura 13).

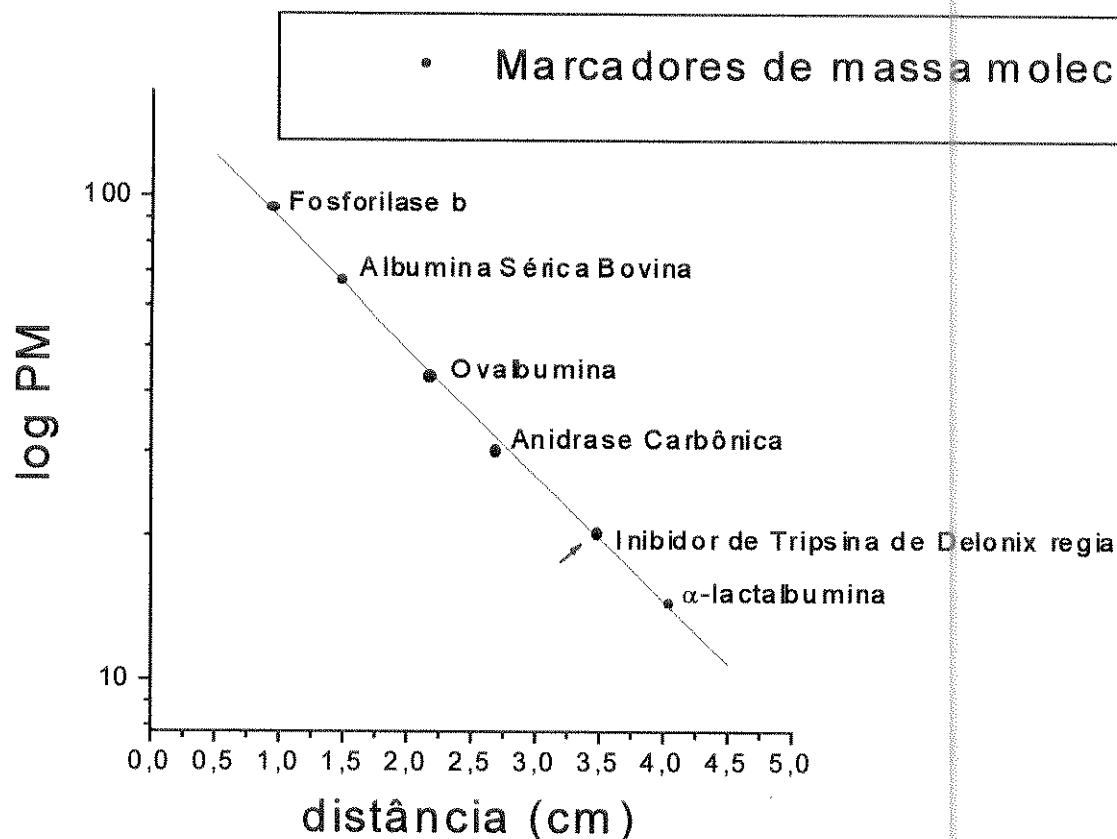


Figura 13. Determinação da massa molecular aparente do inibidor de *Delonix regia*, através de eletroforese em gel de poliacrilamida (10-20%).

6. CRISTALIZAÇÃO DO INIBIDOR

O inibidor DrTI foi submetido a uma precipitação por PEG 6000, usando o método de crescimento por difusão a vapor. Através deste método foi possível obter cristais pertencentes ao grupo espacial ortorrombico com dimensões de $a=3,15\text{ \AA}$, $b=69,39\text{ \AA}$ e $c=72,54\text{ \AA}$. O ajuste final dos dados está 89,3% entre $13\text{ \AA}$ e resolução de $2,95\text{ \AA}$. A perfeição dentro da última cápsula de resolução foi de 96%. Um total de 8199 reflexões foram coletadas, dentre as quais 3326 reflexões foram únicas. Considerando uma massa molecular de aproximadamente 22 kDa e uma única molécula de DrTI por unidade de célula (cristal) assimétrica, o volume do cristal foi de $1,92\text{ A}^3/\text{Da}$ (Matthews, 1968). Estes dados indicam a presença de um único tipo de molécula de DrTI na unidade celular (cristal) assimétrica.

Os cristais do DrTI foram melhor resolvidos usando uma resolução de $2,5\text{ \AA}$, a mesma resolução da estrutura do inibidor de *Erythrina caffra* (figura 14). A função de rotação foi calculada usando dados de difração num limite de resolução de $10\text{ \AA}$ - $3,3\text{ \AA}$ e um raio Patterson de $20\text{ \AA}$. O pico de rotação correspondente à solução correta foi o mais alto (CC de 25,1%). A função de tradução resultou numa solução clara com o CC de 39,7% e fator de resolução de 53,6%. O modelo foi finalmente submetido a um refinamento rígido num limite de resolução de $10\text{ \AA}$ até $3,3\text{ \AA}$, o qual melhorou o fator de resolução (52,7%) e o coeficiente de correlação (40,4%). Este refinamento foi realizado através do programa REFMAC, da série de programas CCP4 (Projeto Colaborativo Computacional, Número 4, 1994).

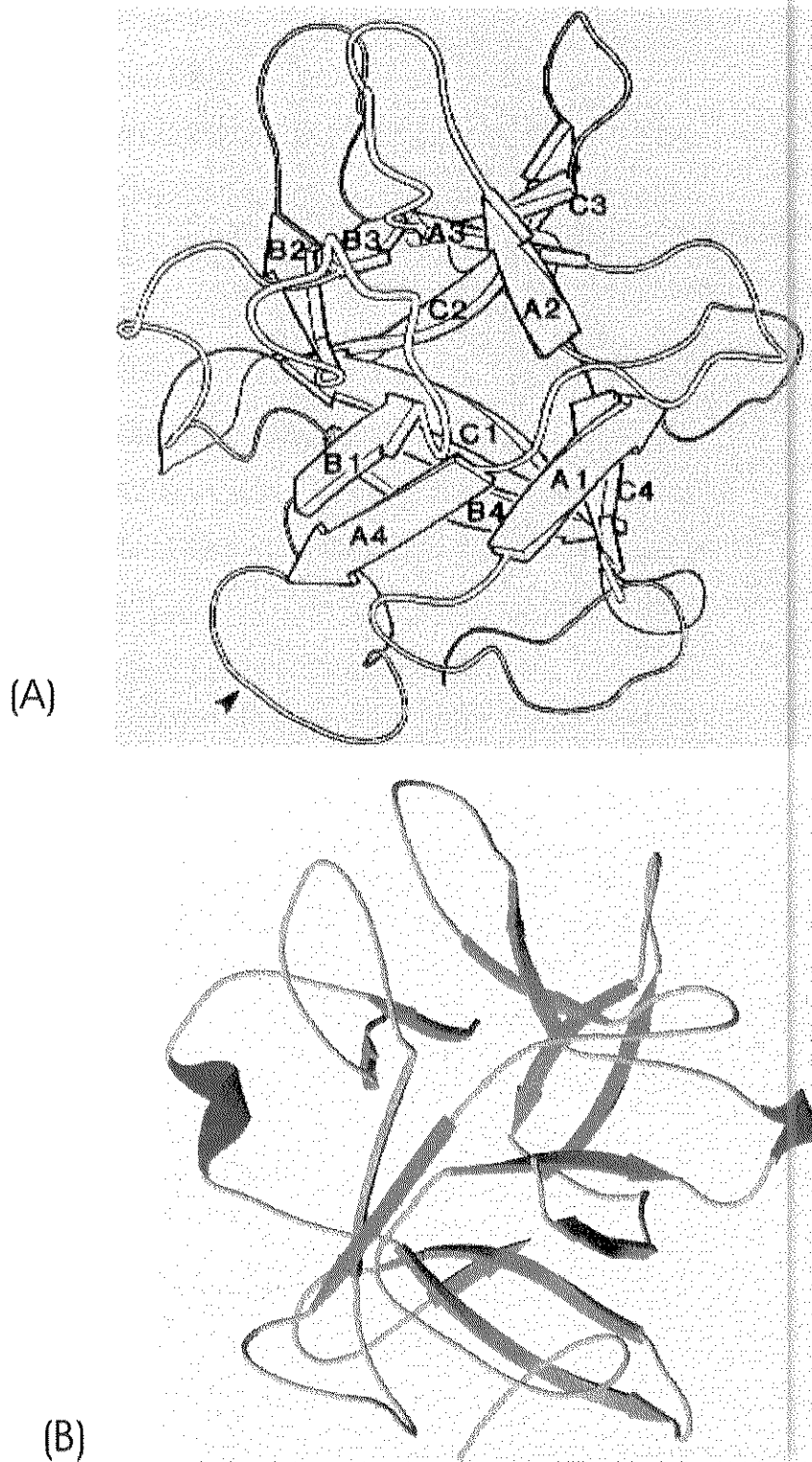


Figura 14. Estrutura dos inibidores de tripsina do tipo Kunitz de sementes de *Erythrina caffra* (A) e de *Delonix regia* (B). A leitura dos cristais desses inibidores foi realizada pelo método de difração de raios-X.

DISCUSSÃO

As sementes das leguminosas contêm um alto teor de proteínas em relação às outras partes da planta. Em particular, dois grupos de plantas, os cereais e as leguminosas, são de grande importância nutricional e econômica uma vez que o seu conteúdo protéico constitui-se em componentes importantes para a alimentação humana e animal. Dentre essas proteínas estão os inibidores de proteinases, particularmente inibidores de enzimas da família das serinoproteinases (Richardson, 1977).

Esses inibidores provocam efeitos adversos quando ingeridos na dieta, podendo interferir direta ou indiretamente na digestão e absorção de proteínas ou por afetar as funções de digestão e absorção de células intestinais limitando assim, o uso dessas sementes na nutrição humana e animal (Birk, 1989).

Os métodos utilizados para a extração e purificação do inibidor de *Delonix regia*, são aqueles usados para proteínas vegetais. A extração geralmente é feita a partir da farinha de sementes inteiras, salvo em alguns casos em que é preciso remover o tegumento das sementes, ou seja, descascá-las para eliminar pigmentos ou outras substâncias como polifenóis e alcalóides que possam interferir nas etapas de purificação subsequentes (Richardson, 1991). O extrato das sementes em estudo, não apresentou qualquer substância que pudesse dificultar as análises posteriores e, por isso, foi utilizada a farinha das sementes inteiras.

A solubilidade das proteínas é muito variável e a escolha do solvente para efetuar a precipitação dessas proteínas apresenta alguma dificuldade em função dessa solubilidade. Os inibidores semelhantes à albumina, presentes em trigo e arroz, foram extraídos em água (Poerio *et al.*, 1989), enquanto que os inibidores do tipo globulina são extraídos em solução de 0,1M de NaCl (Sanchez-Monge *et al.*, 1986a). Além disso, soluções diluídas de ácido clorídrico e ácido sulfúrico também podem ser usadas para a extração de proteínas (Odani *et al.*, 1986) ou ainda tampões como acetato de sódio e etanol (Lyons *et al.*, 1987). Algumas proteínas de reserva de cereais, que incluem vários inibidores de proteinases e α -amilase são extraídos com misturas de clorofórmio e metanol (Salcedo *et al.*, 1982).

Muitas sementes contêm níveis elevados de lipídios, que podem impedir a extração dos inibidores de proteinases em meio aquoso e causar problemas durante a centrifugação. A retirada do excesso de lipídios pode ser feita através da extração com acetona fria à temperatura de -20°C (Richardson, 1991).

A escolha da acetona como solvente para a extração inicial do inibidor foi baseada na literatura, onde diversos autores (Oliva *et al.*, 1988; Tanaka 1991; Sallai 1993) utilizaram este procedimento para os inibidores das sementes de *Enterolobium contortisiliquum*, *Torresea cearensis* e *Bauhinias*, respectivamente. O fracionamento das proteínas por acetona pode acarretar a perda da atividade biológica. Entretanto com as sementes de *Delonix regia*, não houve perda da atividade do inibidor após esta etapa (figura 6), pois a atividade presente nos extratos salinos das sementes foi preservada durante as demais etapas de purificação.

Existem vários métodos para se determinar a inibição de proteases. O método mais conhecido é o ensaio padrão baseado na medida do decréscimo da atividade enzimática induzida pela adição de quantidades crescentes de inibidor, juntamente com uma solução padrão de enzima em presença de seu substrato específico. A atividade residual da enzima é plotada versus as quantidades de amostras adicionadas, resultando numa curva de inibição. Desta curva é possível obter a quantidade de enzima inibida por uma determinada quantidade de inibidor. Pode-se monitorar o decréscimo da hidrólise de substratos protéicos (caseína, azocaseína ou haemoglobina) ou sintéticos como o BAPNA ou APANA, para a tripsina e BTPNA ou BTEE, para a quimotripsina. Os substratos sintéticos são geralmente usados devido à sua maior especificidade, o que permite diferenciar entre as atividades proteolíticas individuais (Belitz & Weder, 1990).

A medida da inibição máxima das enzimas é feita espectrofotometricamente ou titulometricamente (Kassel, 1970; Bergmeyer, 1974). No presente trabalho foi utilizado o método espectrofotométrico.

Weder (1981) utiliza outro método, que consiste em coloração negativa usando uma diazotização do (β -Naftol pela hidrólise do substrato APNE, segundo Uriel & Berges (1968). Através deste método é possível detectar os inibidores de proteinases em gel de poliacrilamida após a focalização isoelétrica.

A determinação da atividade dos inibidores de tripsina é importante para a análise do seu conteúdo nos alimentos (Rackis *et al.*, 1986). O extrato das sementes de *Delonix regia* foi testado para se determinar a atividade do inibidor sobre a tripsina, segundo metodologia descrita por Weder (1981). O resultado obtido com este ensaio revelou que a atividade do inibidor de tripsina de *Delonix regia* foi de 0,503 mg/g das preparações. Este resultado é compatível com a literatura, cujos valores da atividade inibitória da soja foram de 0,1mg/g a 0,9 mg/g das preparações (Schulze *et al.*, 1992).

A caracterização de inibidores nas sementes tem um importante papel tanto do ponto

de vista nutricional, pois muitas destas sementes são usadas como alimento, como do ponto de vista bioquímico, sendo importantes modelos para entender processos biológicos de proteólise. Os inibidores são importantes na determinação da qualidade nutricional das sementes das leguminosas, que é dependente não somente do conteúdo de proteínas e composição de aminoácidos, mas também da presença de fatores antinutricionais, incluindo os inibidores de proteinases. Esses inibidores inativam suas enzimas, ocasionando redução na digestibilidade e absorção protéica e, em muitos animais, uma redução no ganho de peso (Liener & Hasdai, 1986). Além disso, os inibidores enzimáticos de plantas são de significância nutricional positiva, uma vez que muitos deles são proteínas ricas em aminoácidos contendo enxofre, usualmente cisteína. A remoção destas proteínas da semente pode resultar em uma proteína de composição pobre deste aminoácido. E ainda, muitos inibidores têm sido implicados na defesa das plantas contra ataques microbiais e de insetos (Tan-Wilson & Wilson, 1986).

A elucidação da especificidade dos inibidores de proteinases é, sem dúvida, uma das mais importantes formas usadas para o esclarecimento dos mecanismos de ação e do controle da atividade das enzimas envolvidas nos mais variados processos fisiológicos (Wenzel & Tschesche, 1995).

O estudo cinético utilizado para a inibição foi baseado no modelo do tipo "slow tight-binding", proposto por Morrison (1982). Neste modelo, "slow", significa que a inibição não é imediata. A inibição tipo "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 de afinidade entre a enzima e o inibidor e quanto menor for o K_i , mais forte é a interação do inibidor com a enzima alvo.

O inibidor de *Delonix regia* atuou sobre a tripsina bovina e porcina, sendo que inibição, para estas duas enzimas, foi da mesma ordem de grandeza ($10^{-8}M$). As curvas de inibição da tripsina estão apresentadas nas figuras 4 e 5. A quimotripsina, uma outra enzima do processo digestivo, não foi inibida pelo inibidor de *Delonix regia*. Este resultado sugere que o sítio reativo desse inibidor pode ser reconhecido apenas pela tripsina ou por uma enzima semelhante à tripsina ("trypsin-like").

A possível aplicação terapêutica de inibidores de calicreína, no controle de processos fisiopatológicos, tais como, coagulação sanguínea, relacionado ao sistema calicreína-cinina, tem levado a numerosos estudos deste tipo de inibidores em plantas (Chong & Reeck, 1987; Sampaio *et al.*, 1990; Lopes, 1992; Sallai, 1993).

No presente trabalho, três serinoproteinases envolvidas na cascata de coagulação sanguínea foram testadas com o inibidor de *Delonix regia*. A plasmina e o Fator Xa não foram inibidas pelo DrTI, sendo que esta última enzima é inibida por poucos inibidores vegetais. Sallai (1993) descreveu a inibição do fator Xa pelos inibidores de *Bauhinia rufa* e *Bauhinia unguolata*, porém com o inibidor de *Bauhinia forficata* não houve inibição. A calicreína plasmática humana, uma outra importante enzima do processo de coagulação sanguínea, foi inibida pelo DrTI, sendo que o valor da constante de dissociação foi menor para esta enzima ($5 \times 10^{-9}\text{M}$), indicando uma maior afinidade entre a enzima e o inibidor (tabela 1). Resultado similar foi obtido com o inibidor de *Swartzia pickellii* (Cavalcanti, 1994). A calicreína é geralmente inibida por inibidores de tripsina do tipo Kunitz (Sampaio *et al.*, 1992) mas não por inibidor de quimotripsina do tipo Kunitz (Souza *et al.*, 1995).

A maioria das pessoas apresenta algum problema relacionado a hemorragias e coagulação sanguínea, por isso, muitos inibidores fisiológicos, como o (α_2 - macroglobulina e o C1 inibidor, atuam eficientemente no controle das proteínas da cascata de coagulação sanguínea (Travis & Salvesen, 1983), em condições normais. Entretanto existem inibidores vegetais, que são relativamente fáceis de se obter e que também são eficientes para o estudo de muitas propriedades dessas proteínas (Sampaio *et al.*, 1990).

O processo de purificação de inibidores de proteinases a partir do extrato de várias espécies de plantas leguminosas, geralmente consiste na utilização de duas técnicas amplamente utilizadas, a cromatografia de afinidade em tripsina-Sepharose e a cromatografia de troca iônica (Richardson, 1977). A purificação dos inibidores estudados por Batista (1997), foi realizada basicamente por cromatografia de afinidade em tripsina-Sepharose. Este procedimento pode representar risco de proteólise do inibidor, caso a tripsina não esteja imobilizada em um forma inativa, podendo destruir a atividade do inibidor e ocasionando heterogeneidade nas preparações obtidas (Belitz & Weder, 1990). Entretanto há um método alternativo que seria o uso de uma resina de anidro-tripsina-Sepharose, uma vez que neste caso, a enzima imobilizada na resina possui um resíduo de desidro-alanina no seu sítio ativo, que permite a purificação do inibidor, evitando assim a sua proteólise (Xavier-Filho & Campos, 1983). Este procedimento apresenta resultados razoáveis quanto ao rendimento de purificação (Oliva, 1986), sendo uma alternativa para a purificação do inibidor de *Delonix regia*, visando a obtenção de um maior rendimento, uma vez que a cromatografia de troca iônica permitiu a purificação do DrTI em 343 vezes, porém com um rendimento de apenas 3% (tabela 3).

A atividade específica do inibidor aumentou conforme foram sendo realizadas as etapas de purificação, sendo de 0,056 no início e 2,3 no final. Este resultado é esperado uma vez que é indicativo do grau de pureza de uma proteína. Os dados estão compatíveis com aqueles encontrados na literatura (Tanaka, 1991; Oliva, 1986; Lin *et al.*, 1991).

Os inibidores tipo Kunitz extraídos das sementes das leguminosas e que pertencem à sub-família Caesalpinioideae (*Bauhinia rufa*, *Bauhinia ungulata* e *Bauhinia forficata*), são proteínas que apresentam cadeia polipeptídica única, com massa molecular de aproximadamente 20 kDa (Sallai *et al.*, 1992). De acordo com estudos realizados em sementes de *Caesalpinia pulcherrima*, que pertence à subfamília Caesalpinioideae, foi demonstrada somente a presença de inibidor da família Kunitz, sendo considerada a subfamília mais primitiva, enquanto que as espécies da subfamília Papilionoideae, apresentou apenas inibidores da família Bowman-Birk e, por isso, é considerada a subfamília mais evoluída (Norioka *et al.*, 1983). Este fato sugere que há alguma relação entre as famílias de inibidores encontrados em sementes de leguminosas e a evolução destas plantas.

É importante ressaltar que os inibidores do tipo Kunitz purificados de sementes das subfamílias Caesalpinioideae e Papilionoideae apresentam apenas uma cadeia polipeptídica, enquanto que aqueles purificados das sementes da subfamília Mimosoideae são proteínas compostas por duas cadeias polipeptídicas. A razão da existência dessas duas cadeias se deve, provavelmente, à proteólise da porção C-terminal de uma cadeia única de um inibidor primitivo, originando assim, o inibidor de duas cadeias (Richardson *et al.*, 1986; Batista *et al.*, 1996).

A análise do perfil de massa molecular do inibidor, em SDS-PAGE, revelou que essa proteína apresentou cadeia polipeptídica única, mesmo em condições redutoras, com 0,1M de DTT e uma massa molecular aparente de 22 kDa (figura 13), sugerindo ser um inibidor do tipo Kunitz. É possível verificar que em condições redutoras, o inibidor apresentou massa molecular aparente maior que aquela determinada em condições não redutoras. Isto ocorreu devido à redução das pontes dissulfeto intracadeia, fazendo com que a cadeia polipeptídica ficasse "esticada", aumentando o grau de dificuldade para a penetração no gel de poliacrilamida.

Estes resultados de pureza permitiram submeter o inibidor DrTI aos estudos de cristalografia de raio-X, com o objetivo de elucidar as possíveis diferenças estruturais que

contribuem para a expressão da atividade biológica dos inibidores de proteinases.

A estrutura do DrTI foi resolvida pelo método de substituição molecular, usando modelo cristalográfico já existente, como o inibidor de tripsina tipo Kunitz de sementes de *Erythrina caffra* (Onesti *et al.*, 1991).

O DrTI, assim como outros inibidores vegetais, podem ser usados como ferramentas para investigar o mecanismo catalítico das enzimas digestivas e da calicreína plasmática por exemplo, além disso, a aplicação clínica desses inibidores de tripsina poderá ser possível futuramente (Nakagaki *et al.*, 1996).

É importante considerar ainda que este trabalho poderá contribuir para o desenvolvimento de um método que discrimine as dosagens de calicreína plasmática, através da inibição específica dessa enzima pelo inibidor em estudo. Nestas circunstâncias, pode-se prever o esclarecimento, ainda que parcial, dos mecanismos envolvidos na ativação da fase intrínseca da coagulação do sangue.

A continuidade dos estudos com esse inibidor tornará possível aprimorar o refinamento da resolução nos estudos cristalográficos, determinar a região molecular que contém o sítio reativo e realizar estudos de propriedades cinéticas do inibidor. Isso contribuirá para a caracterização físico-química dos inibidores das sementes de leguminosas da subfamília Caesalpinioideae, sendo importantes modelos para o estudo do processo de evolução dessas plantas. Embora os estudos sobre as propriedades dos inibidores de enzimas proteolíticas sejam amplos, o presente trabalho vem mostrar que existem vários aspectos que merecem ser abordados, seja pela descoberta de novos inibidores, com potencial de aplicação em campos diversos, seja por gerarem novas linhas de pesquisa.

CONCLUSÃO

A realização deste trabalho permitiu purificar uma proteína de sementes de *Delonix regia*. Essa proteína foi caracterizada como um inibidor específico para tripsina (enzima digestiva) e para a calicreína plasmática humana (enzima da coagulação sanguínea).

A análise através da eletroforese em gel de poliacrilamida revelou que essa proteína apresenta uma única banda de proteína e uma única cadeia polipeptídica, mesmo em condições redutoras (0,1M de DTT). A massa molecular aparente foi de 22 kDa, sugerindo que este inibidor pertence à família de inibidores vegetais do tipo Kunitz.

Os resultados de pureza permitiram submeter esse inibidor a estudos cristalográficos, por meio de difração de raios-X. O modelo molecular obtido foi similar àquele encontrado para o inibidor do tipo Kunitz isolado de sementes de *Erythrina caffra*.

COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS E PUBLICAÇÕES

XXVI Reunião Anual da SBBq (Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular). Caxambu - MG, 03 - 06 de Maio de 1997.

"PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF TRYPSIN INHIBITOR FROM *Delonix regia* SEEDS". Pando, S.C.; Di Ciero, L.; Novello, J.C.; Oliveira, B. and Marangoni, S.

XXVII Reunião Anual da SBBq (Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular). Caxambu - MG, 23 - 26 de Maio de 1998.

"A SERINE PROTEINASE INHIBITOR FROM *Delonix regia* SEEDS". Pando, S.C.; Di Ciero, L.; Oliva, M.L.V.; Novello, J.C.; Oliveira, B. and Marangoni, S.

A purificação do DrTI permitiu a realização de estudos cristalográficos do inibidor. Os resultados foram submetidos à revista: "Acta Crystall. D"

"PURIFICATION, CRYSTALLIZATION AND CRYSTALLOGRAPHIC STUDY OF THE TRYPSIN INHIBITOR FROM SEEDS OF *Delonix regia*". Polikarpov, I; Golubev, A.M.; Perles, L.A.; Pando, S.C.; Novello J.C. and Marangoni, S.

Os resultados obtidos com a realização deste trabalho serão submetidos à revista: "Biochemistry Molecular Biology International"

"PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A SERINOPROTEINASE INHIBITOR FROM *Delonix regia* SEEDS". Pando, S.C.; Oliva, M.L.V.; Novello, J.C.; Oliveira, B. and Marangoni, S.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antcheva, N.; Patthy, A.; Athanasiadis, A.; Tchorbanov, B.; Zakhariyev, S. & Pongor, S. (1996). Primary structure and specificity of a serine proteinase inhibitor from paprika (*Capsicum annuum*) seeds. **Biochim. Biophys. Acta**, **1298**: 95-101.
- Batista, I.F.C. (1997). Estrutura e especificidade de inibidores do tipo SBTI da família Kunitz das sementes de *Bauhinia unguolata*, *Bauhinia variegata*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Leucaena leucocephala* e *Swartzia pickellii*. Tese de Doutorado. Escola Paulista de Medicina. São Paulo.
- Batista, I.F.C.; Oliva, M.L.V.; Araujo, M.S.; Sampaio, M.U.; Richardson, M.; Fritz, H. & Sampaio, C.A.M. (1996). Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. **Phytochemistry**, **41**: 1017-1022.
- Baumgartner, B. & Chrispeels, M.J. (1976). Partial characterization of a protease inhibitor which inhibits the major endopeptidase present in the cotyledons of mung beans. **Plant Physiol.**, **58**:1-6.
- Belitz, H.D. & Weder, J.K.P. (1990). Protein inhibitor of hydrolases in plant foodstuffs. **Food Ver. Int.**, **6**: 151-211.
- Bergmeyer, H.V. (1974). Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.V. ed.). Academic Press. New York.
- Birk, Y. (1985). The Bowman-Birk Inhibitor. **Int. J. Peptide Prot. Res.**, **25**: 113-131.
- Birk, Y. (1989). Protein protease inhibitors of plant origin and their significance in nutrition. In: Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds (Huisman, J.; van der Poel, A.F.B. and Liener, I.E. eds.). Predoc., Wageningen, The Netherlands.
- Bishop, P. D.; Pearce, G.; Bryant, J. E. & Ryan, C. A. (1984). Isolation and characterization of the proteinase inhibitor-inducing factor from tomato leaves. **J. Biol. Chem.**, **259**: 13172-13177.
- Bode, W. & Huber, R. (1991). Proteinase-protein inhibitor interaction. **Biomed. Biochim. Acta**, **50**: 437-446.
- Bode, W. & Huber, R. (1992). Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. **Eur. J. Biochem.**, **204**: 433-441.
- Bode, W.; Brandstetter, H.; Mather, T. & Stubbs, M. (1997). Comparative analysis of haemostatic proteinases: structure aspects of thrombin, factor Xa, factor IXa and protein C. **Thromb. Haemost.**, **78**: 501-511.
- Borches, R. & Ackerson, C. W. (1947). Trypsin inhibitor IV. Occurrence in seeds of the Leguminosae and other seeds. **Arch. Biochem. Biophys.**, **13**: 291-293.

- Bowles, J. D. (1990). Defense-related proteins in higher plants. **Ann. Rev. Biochem.**, **59**: 873-875.
- Breddam, K.; Widmer, F. & Meldal, M. (1991). Amidation of growth hormone releasing factor (1-29) by serine carboxypeptidase catalysed transpeptidation. **Int. J. Pept. Protein Res.**, **37**: 153-160.
- Broadway, R. M. & Duffey, S. S. (1986b). The effect of dietary protein on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **J. Insect Physiol.**, **32**: 673-680.
- Broadway, R. M. & Duffey, S. S. (1988). The effect of protein plant quality on insect digestive physiology and the toxicity of plant proteinase inhibitors. **J. Insect Physiol.**, **34**: 1111-1117.
- Brown, W. E.; Takio, K.; Titani, K. & Ryan, C. (1985). Wounded-induced trypsin inhibitor in alfalfa leaves. Identity as a member of the Bowman-Birk inhibitor family. **Biochemistry**, **24**: 2105-2108.
- Cavalcanti, M.S.M. (1994). Purificação e caracterização de uma lectina e de um inibidor de serinoproteinase de sementes de *Swartzia pickellii* (Killip). Tese de Doutorado. Escola Paulista de Medicina. São Paulo.
- Chase, T. & Shaw, E. (1970). Titration of trypsin, plasmin and thrombin with p-nitrophenyl-p-guanidinobenzoate HCl. **Meth. Enzymol.**, **19**: 20-27.
- Chong, G.L. & Reeck, G.R. (1987). Interaction of trypsin, (Factor XIIa and plasma kallikrein with a trypsin inhibitor isolated from barley seeds: a comparison with the corn inhibitor of activated Hageman Factor. **Thromb. Res.**, **48**: 211-221.
- Churella, H.R.; Yao, B.C. & Thomson, W.A.B. (1976). Soybean trypsin activity of soy infant formulas and its nutritional significance for the rat. **J. Agric. Food. Chem.**, **24**: 393-396.
- Colman, R.W.; Marder, V.J.; Salzman, E.W. & Hirsh, J. (1982). Plasma coagulation factors. In: Hemostasis and Thrombosis (Colman, R.W.; Hirsh, J.; Marder, V.J. & Salzman, E.W. eds.). J. B. Lippincott, Philadelphia.
- Corey, D.R. & Craik, C.S. (1993). Trypsin: a model enzyme of the introduction of novel properties into proteins. In: Innovations in proteases and their inhibitors (Avilés, F.X. ed.). Editora de Gruyeter, Berlin.
- Correa, P. (1981). Epidemiological correlations between diet and cancer frequency. **Cancer Res.**, **41**: 3685-3690.
- Creighton, T.E. & Darby, N. J. (1989). Functional evolutionary divergence of proteolytic enzymes and their inhibitors. **Trends Biochem. Sci.**, **14**: 319-325.

- Davie, E.W. (1995). Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade. **Thromb. Haemost.**, **74**: 1-6.
- Davie, E.W.; Fujikawa, K. & Kisiel, W. (1991). The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. **Biochemistry**, **30**: 10365-10370.
- Declerck, Y.A. & Imren, S. (1994). Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer. **Eur. J. Cancer**, **30A**: 2170-2180.
- Deguchi, K.; Takeya, H.; Gabazza, E.C.; Nishioka, J. & Susuzi, K. (1997). Orothrombin kringle 1 domain interacts with factor Va during assembly of prothrombinase complex. **Biochem. J.**, **321**: 429-435.
- Devlin, T.M. (1992). **Textbook of biochemistry: with clinical correlations**. 3rd ed. Wiley-Liss, New York. 1185p.
- Dufton, M.J. (1990). Could domain movements be involved in the mechanism of trypsin like serine proteases? **FEBS Lett.**, **271**: 9-13.
- Erlanger, B.F.; Kolowsky, N. & Cohen, N. (1961). Preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Arch. Biochem. Biophys.**, **95**: 271 - 278.
- Fagan, J.M. & Waxman, L. (1991). Identification of a soluble enzyme from C3H/10T1/2 cells which is inhibited by Bowman-Birk proteinase inhibitor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **178**: 856-861.
- Felton, G. W.; Broadway, R. W. & Duffey, S. S. (1989). Inactivation of protease inhibitor activity by plant-derived quinones: complications for host-plant resistance against noctuid herbivores. **J. Insect Physiol.**, **35**: 981-990.
- Frokiaer, H.; Horlyck, L.; Sorensen, S. & Sorensen, H. (1994). Immunoaffinity chromatography purification and characterization of pea trypsin inhibitors. **J. Sci. Food Agric.**, **66**: 61-69.
- Godbole, S. A.; Krishna, T. G. & 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.
- Green, T. R. & Ryan, C. A. (1972). Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible mechanism against defense insects. **Science**, **175**: 776-777.
- Griffin, J.H. (1995). The thrombin paradox. **Nature**, **378**: 337-338.
- Haldar, U.C.; Saha, S.K.; Beavis, R.C. & Sinha, N.K. (1996). Trypsin inhibitors from ridged gourd (*Luffa acutangula* Linn.) seeds: Purification, properties and amino acid sequence. **J. Prot. Chem.**, **15**: 177-184.
- Halkier, T. (1991). Mechanisms in blood coagulation, fibrinolysis and the complement system. Cambridge University Press, Cambridge. 467p.

- Hara, S.; Marino, J. & Ikenaka, T. (1989). Aminoacids sequence and dissulfide bridges of serine proteinase inhibitors from bitter gourd (*Momordica charantia* L.) seeds. **J.Biochem.**, **105**: 88-92.
- Hartl, P. M.; Tan-Wilson, A. L. & Wilson, K. A. (1986). Proteolysis of Kunitz soybean trypsin inhibitor during germination. **Phytochemistry**, **25**: 23-26.
- Hayashi, K.; Takehisa, T.; Hamato, N.; Takano, R.; Hara, S.; Miyata, T. & Kato, H. (1994). Inhibition of serine proteinases of the blood coagulation system by squash family protease inhibitors. **J. Biochem.**, **116**: 1013-1018.
- Hedstrom, L.; Szilagyi, L. & Rutter, W. (1992). Converting trypsin to chymotrypsin: The role of surface loops. **Science**, **255**: 1249-1253.
- Hejgaard, J.; Dam, J.; Petersen, L.C. & 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.
- Herwald, H.; Renné, T.; Meijers, J.C.M.; Chung, D.W.; Page, J.D.; Colman, R.W. & Muller-Esterl, W. (1996). Mapping of the discontinuous kininogen binding site of prekallikrein. **J. Biol. Chem.**, **271**: 13061-13067.
- Heywood, V.H. (1971). The leguminosae. A systematic purview. In: Chemataxonomy of the leguminosae (Harbone, J. B.; Boulter, D. & Turner, B.L. eds.). Academic Press, New York.
- Jongsma, M. A. & Bolter, C. (1997). The adaptation of insects to plant protease inhibitors (Review). **J. Insect Physiol.**, **43**: 885-895.
- Jordão, B.P.; Lehane, M.J.; Terra, W.R.; Ribeiro, A.F. & Ferreira, C. (1996). An immunocytochemical investigation of trypsin secretion in the midgut of the stablefly, *Stomoxys calcitrans*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, **25**: 445-453.
- Joubert, F.J. & Dowdle, E.B.D. (1987). The primary structure of the inhibitor of tissue plasminogen activator found in the seeds of *Erythrina caffra*. **Thromb. Haemost.**, **57**: 356-360.
- Kaslik, G.; Patthy, A. Bálint, M. & Gráf, L. (1995). Trypsin complexed with (α -1-proteinase inhibitor has an increased structural flexibility. **FEBS Lett.**, **370**: 179-183.
- Kassel, B. (1970). Naturally occurring inhibitors of proteolytic enzymes. **Meth. Enzymol.**, **19**: 839-932.
- Kennedy, A.R.; Radner, B.S. & Nagasawa, H. (1984). Protease inhibitors reduce the frequency of spontaneous chromossome abnormalities in cells from patients with Bloom Syndrome. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **81**: 1827-1830.
- Kirsi, M. & Mikoka, J. (1971). Occurrence of proteolytic inhibitors in various tissues of barley. **Planta**, **96**: 281-291.

- Koide, T. & Ikenaka, T. (1973a). Studies on soybean trypsin inhibitors. Fragmentation of soybean trypsin inhibitor (Kunitz) by limited proteolysis and by chemical cleavage. **Eur. J. Biochem.**, **32**: 401-407.
- Koide, T. & Ikenaka, T. (1973b). Studies on soybean trypsin inhibitors. Amino acid sequences of the carboxyl-terminal region and the complete amino acid of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). **Eur. J. Biochem.**, **32**: 417-431.
- Koide, T.; Tsunasawa, S. & Ikenaka, T. (1973). Studies on soybean trypsin inhibitors. Amino acid sequence around the reactive site of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). **Eur. J. Biochem.**, **32**: 408-416.
- Kortt, A. A & Caldwell, J.B. (1990). Low molecular weight albumins from sunflower seed: identification of a methionine rich albumin. **Phytochemistry**, **9**: 2805-2810.
- Kunitz, M. (1945). Crystallization of trypsin inhibitors from soybean. **Science**, **101**: 668-669.
- Kunitz, M. (1946). Crystalline soybean trypsin inhibitor. **J. Gen. Physiol.**, **29**: 149-154.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**: 680-685.
- Larkins, B. A. (1981). Seeds storage proteins: Characterization and biosynthesis. In: *The Biochemistry of Plants*. Vol. 6. Academic Press, Inc.
- Liener, I.E. & Hasdai, A. (1986). The effect of the long term feeding of raw soy flour on the pancreas of the mouse and hamster. **Adv. Exp. Med. Biol.**, **199**: 189-197.
- Lin, J.Y.; Chu, S.C.; Wu, H.C. and Hsieh, Y.S. (1991). Trypsin inhibitor from seeds of *Acacia confusa*. **J. Biochem.**, **110**: 879-883.
- Lin, Y.; Shenoy, S.S.; Harris, R.B.; & Colman, R.W. (1996). Direct evidence for multifacial contacts between high molecular weight kininogen and plasma prekallikrein. **Biochemistry**, **35**: 12945-12949.
- Lipke, H.; Fraenkel, G. S. & 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 da calicreína plasmática humana e fator Xa, por inibidores protéicos. Tese de Mestrado. Escola Paulista de Medicina. São Paulo.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, **193**: 265-275.
- Lyons, A.; Richardson, M.; Tatham, A.S. & Shewry, P. R. (1987). Characterization of homologous inhibitors of trypsin and α -amylase from seeds of rye (*Secale cereale* L.). **Biochim. Biophys. Acta**, **915**: 305-313.

- Macphalen, C.A. & James, M.N.G. (1988). Structural comparison of two serine proteinase-protein inhibitor complexes: eglin-C-subtilisin carlsberg and CI-2-subtilisin. **Biochemistry**, **27**: 6582-6598.
- Markwick, N. P.; Reid, S. J.; Laing, W. A. & Christeller, J. T. (1995). Effect of dietary protein and proteinase inhibitors on codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). **J. Econ. Entomol.**, **88**: 33-39.
- Matthews, B.W. (1968). Solvent content of protein crystals. **J.Mol.Biol.**, **33**: 491-497.
- McPherson, A. (1982). **Preparation and analysis of protein crystals**. John Wiley, New York.
- Morrison, J.F. (1982). The slow-binding and slow tight-binding inhibition of enzyme catalyzed reactions. **Trends Biochem. Sci.**, **7**: 102-105.
- Morrissey, J.H.; Neuenschwander, P.F.; Huang, Q.; McCallum, C.D.; Su, B. & Johnson, A.E. (1997). Factor VIIa-tissue factor: functional importance of protein - membrane interactions. **Thromb. Haemost.**, **78**: 112-116.
- Mosolov, V. V; Loginova, M. D.; Fedurkina, N. V. & Benken, I. I. (1976). The biological significance of proteinase inhibitors in plants. **Plant Sci. Lett.**, **7**: 77-80.
- Nakagaki, T.; Shibuya, Y.; Kouzuma, Y.; Yamasaki, N. and Kimura, M. (1996). Inhibitory potency of *Erythrina variegata* proteinase inhibitors toward serine proteinases in the blood coagulation and fibrinolytic systems. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, **60**: 1383-1385.
- Neurath, H. (1993). The regulation of protease action: An overview. In: Innovations in proteases and their inhibitors (Avilés, F.X. ed.). Editora de Gruyeter, Berlin.
- Norioka, S. & Ikenaka, T. (1983). Aminoacid sequences of trypsin-chymotrypsin inhibitors (A-I, A-II, B-I and BII) from peanut (*Arachis hipogaea*): a discussion on the molecular evolution of legume Bowman-Birk type inhibitors. **J. Biochem.**, **94**: 589-599.
- Odani, S.; Koide, T. & Ono, T. (1986). Wheat germ trypsin inhibitors. Isolation and structural characterization of a single-headed and double-headed inhibitor of the Bowman-Birk type. **J. Biochem.**, **100**: 975-983.
- Oliva, M.L.V. (1986). Isolamento e caracterização preliminar de inibidores de proteinases de sementes de *Enterolobium contortisiliquum*, *Torresea cearensis*, *Bauhinia pentandra* e *Bauhinia bauhinioides*. Tese de Doutorado. Escola Paulista de Medicina. São Paulo.
- Oliva, M.L.V.; Grisolia, D.; Sampaio, M.U. & Sampaio, C.A.M. (1982). Properties of highly purified human plasm kallikrein. **Agents and Actions**, **9**: 52-57.
- Oliva, M.L.V.; Sampaio, M.U. & Sampaio C.A.M. (1988). Purification and partial characterization of a thiol proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* beans. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, **24**: 173-196.

- Onesti, S.; Brick, P. and Blow, D.M. (1991). Crystal structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Erythrina caffra* seeds. **J. Mol. Biol.**, **217**: 153-176.
- Orozco-Cardenas, M.; McGurl, B. & Ryan, C. A. (1993). Expression of an antisense prosystemin gene in tomato plants reduces resistance toward *Manduca sexta* larvae. **Proc. Nat. Academy of Science of the USA**, **90**: 8273-8276.
- Otlewski, J. (1993). The squash inhibitors of serine proteinase. In: Innovations in proteases and their inhibitors (Avilés, F.X. ed.). Editora de Gruyeter, Berlin.
- Otwinowski, Z. (1993). Oscillation data reduction program. In: Proceedings of the CCP4 Study Weekend (Sawyer, L., Isaacs, N. & Bailey, S. eds.). SERC, Daresbury Laboratory, Warrington, UK.
- Peterson, G.L. (1979). Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. **Anal. Biochem.**, **100**: 201-220.
- Phillips, M.A. & Fletterick, R.J. (1992). Proteases. **Curr.Opin.Struc.Biol.**, **2**: 713-720.
- Plunkett, G. & Ryan, C. A. (1980). Reduction and carboxymethylation of the single disulfide bond of proteinase inhibitor I from potatoes tubers. **J. Biol. Chem.**, **255**: 2752-2755.
- Plunkett, G.; Senear, D. F.; Zuroske, G. & Ryan, C. A. (1982). Proteinase inhibitors I and II from leaves of wounded tomato plants: purification and properties. **Arch. Biochem. Biophys.**, **213**: 463-472.
- Poerio, E.; Carrano, L.; Garzillo, A. M. & Buonocore, V. (1989). A trypsin inhibitor from the water-soluble protein fraction of wheat kernel. **Phytochemistry**, **28**: 1307-1311.
- Pusztai, A. (1986). Importance of anti-nutritive factors in feeding-stuffs evaluation. In: Feeding-stuffs evaluation, modern aspects, problems and future trends. (Livingstones, M. ed.). FEEDS publication, Aberdeen.
- Puy, D.J. Du; Phillipson, P.B. & Rabevohitra, R. (1995). The genus *Delonix* (Leguminosae-Caesalpinioideae) in Madagascar. **Kew Bulletin**, **50**: 445-475. Rhodes University, South Africa.
- Querol, E.; Molina, M.A.; Daura, X.; Oliva, B.; Marino, C.; Canals, F.; Crane-Robinson, C. & Tapia, O. (1993). Protease inhibitors from vegetables as a target for protein engineering: application to the potato carboxypeptidase inhibitor. In: Innovations in proteases and their inhibitors (Avilés, F.X. ed.). Editora de Gruyeter, Berlin.
- Rackis, J.J.; Wolf, W.J. & Baker, E.C. (1986). Protease inhibitors in plant foods: control and inactivation. In: Nutritional and Toxicological Significance of Enzyme Inhibitors in Foods (Friedman, M. ed.). Plenum Press, New York.
- Ratnoff, O.D. & Davie, E.W. (1962). The activation of Christmas factor to activated plasma thromboplastin antecedent. **Biochemistry**, **1**: 677-685.

- Richardson, M. (1977). The proteinase inhibitors of plants and microorganisms. **Phytochemistry**, **16**: 159-169.
- Richardson, M. (1991). Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. In: *Methods in Plant Biochemistry*. (Dey, P.M. & Harborne, J.B. eds.). vol. 5 Academic Press, New York.
- Richardson, M.; Campos, F.A.P.; Xavier-Filho, J.; Macedo, M.L.R.; Maia, G.M.C. & Yarwood, A. (1986). The amino acid sequence and reative (inhibitory) site of the major trypsin isoinhibitor (DE5) isolated from seeds of the Brazilian caroline tree (*Adenanthera pavonina* L.). **Biochim. Biophys. Acta**, **872**: 134 – 140
- Ryan C.A. & Walker-Simons, M. (1981). Plant proteinases. In: *The Biochemistry of Plants*. (Marcus, E. ed.). Academic Press, New York.
- Ryan C.A. (1973). Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. **Ann. Rev. Plant. Physiol.**, **24**: 173-196.
- Salcedo, G.; Sanchez-Monge, R. & Aragoncillo, C. (1982). The isolation and characterization of low molecular weight hydrophobic salt-soluble proteins from barley. **J. Exp. Bot.**, **33**: 1325-1331.
- Sallai, R. C. (1993). Caracterização de inibidores seletivos de serinoproteinases no gênero *Bauhinia* (Leguminosae-Caesalpinioideae). Tese de Mestrado. Escola Paulista de Medicina. São Paulo.
- Sallai, R.C.; Sobrl, C.S.; Sampaio, M.U. & Araujo, M.S. (1992). Purification and partial characterization of serineproteinase inhibitors from three species of *Bauhinia* (Leguminosae-Caesalpinioideae). In: XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. p. 371. Caxambú-MG.
- Sampaio, C. A. M.; Sampaio, M. U. & Prado, E. S. (1984). Active titration of horse urinnary kallikrein. **Hoppe-Seyler. Physiol. Chem.**, **365**: 297-302.
- Sampaio, C.A.M.; Motta, G.; Sampaio, M.U.; Oliva, M.L.V.; Araujo, M.S.; Stella, R.C.; Tanaka, A.S. & Batista, I.F. (1992). Action of plant proteinase inhibitors on enzymes of the kallikrein kinin system. **Agents and Actions Suppl.**, **36**: 191-199.
- Sampaio, C.A.M.; Oliva, M.L.V.; Sampaio, M.U.; Batista, I.F.C.; Bueno, N. R.; Tanaka, A.S.; Auerswald, A. & Fritz, H. (1996). Plant serine proteinase inhibitors. Structure and biochemical applications on plasma kallikrein and related enzymes. **Immunopharmacology**, **32**: 62-66.
- Sampaio, M. U.; Tanaka, A. S.; Oliva, M. L. V.; Batista, I. F. C.; Motta, G.; Stella, R. C. R. & Sampaio, C. A. M. (1990). Plant proteinase inhibitors. Action on blood clotting contact phase enzymes. In: *Proceedings of the First Brazilian Congress on Proteins* (Filho, B. O. e Sgarbieri, V. eds.). Editora da Unicamp, Campinas.
- Sanchez-Monge, R.; Gomez, L.; Garcia-Olmedo, F. & Salcedo, G. (1986a). A tetrameric inhibitor of insect α -amilase from barley. **FEBS Lett.**, **207**: 105-109.

- Schmaier, A.H. (1997). Contact activation: A revision. **Thromb. Haemost.**, **78**: 101-107.
- Schulze, H.; Huisman, J.; Verstegen, M.W.A. & van Leeuwen, P. (1992). Effect of soya trypsin inhibitors in the diet on trypsin activities in pancreatic tissue and ileal digesta and inhibitor activity in small intestinal digesta of piglets. In: Proceedings of the first anglo-french symposium on human and animal nutrition. Rennes, France.
- Senser, F.; Belitz, H. D.; Kaiser, K. P. & Santarius, K. (1974). Suggestion of a protective function of proteinase inhibitors in potatoes: inhibition of proteolytic activity of microorganisms isolated from spoiled potato tubers. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.**, **155**: 100-101.
- Sleisenger, M.H. & Kim, Y.S. (1979). Protein digestion and absorption. **New Engl. J. Med.**, **300**: 659-663.
- Souza, E.M.T.; Mizuta, K.; Sampaio, M.U. & Sampaio, C.A.M. (1995). Purification and partial characterization of a *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor. **Phytochemistry**, **39**: 521-525.
- Stroud, R. M.; Kossiakoff, A. A. & Chambers, J.L. (1977). Mechanisms of zymogen activation. **Ann. Rev. Biophys. Bioeng.**, **6**: 177-193.
- Takada, A.; Takada, Y.; Urano, T. (1994). The physiological aspects of fibrinolysis. **Thromb. Research**, **76**: 1-31.
- Tanaka, A.S. (1991). Purificação, determinação de especificidade e aspectos estruturais do inibidor de serinoproteínas das sementes de *Torresea cearensis*. Tese de Mestrado. Escola Paulista de Medicina. São Paulo.
- Tanaka, A.S.; Sampaio, M.U.; Marangoni, S.; Oliveira, B.; Novello, J.C.N.; Oliva, M.L.V.; Fink, E. & Sampaio, C.A.M. (1997). Purification and primary structure determination of a Bowman-Birk trypsin inhibitor from *Torresea cearensis* seeds. **Biol. Chem.**, **378**: 273-281.
- Tan-Wilson, A.L. & Wilson, K.A. (1986). Relevance of multiple soybean trypsin inhibitor forms to nutritional quality. In: (Friedman, M. ed.). Nutritional and toxicological significance of enzyme inhibitors in plant foods. Plenum Press, New York.
- Travis, J. & Salvensen, G.S. (1983). Human plasma proteinase inhibitors. **Ann. Rev. Biochem.**, **52**: 655-709.
- Tsunogae, Y.; Tanaka, I.; Yamane, T.; Kikkawa, J.; Ashida, T.; Ishikawa, C.; Watanabe, K.; Nakamura, S. & Takahashi, K. (1986). Structure of the trypsin-binding domain of Bowman-Birk type protease inhibitor and its interaction with trypsin. **J. Biochem.**, **100**: 1637-1643.
- Uriel, J. & Berges, J. (1968). Characterization of natural inhibitors of trypsin and chymotrypsin by electrophoresis in acrylamide-agarose gels. **Nature**, **218**: 578-580.

- Verstraete, M. (1995). The fibrinolytic system: from petri dishes to genetic engineering. **Thromb. Haemost.**, **74**: 25-35.
- Warshel, A.; Naray-Szabo, G.; Sussman, F. & Hwang, J.K. (1989). How do serine protease really work? **Biochemistry**, **28**: 3629-3637.
- Weder, J. K. P. & Link, I. (1993). Effect of treatments on legume inhibitor activity against human proteinases. In: Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds; Proc. 2nd Int. Workshop Antinutritional Factors (ANFs) in Legume Seeds (Van der Poel, A.F.B.; Huisman, J. & Saini, H.S. eds.). Wageningen Pers, Wageningen.
- 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 (Pholhill, R.M. & Roven, P.H. eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, TW9 3AE, England.
- Weder, J. K. P. (1985). Chemistry of legume protease inhibitors and their use in taxonomy. **Qual. Plant Foods Hum. Nutr.**, **35**: 183-194.
- Wenzel, H.R. & Tschesche, H. (1995). Reversible inhibitors of serine proteinases. In: Peptides: Synthesis, Structures and Applications. Academic Press, Inc.
- White, A., Handler, P. & Smith, E. L. (1986). Enzimas Hidrolíticas. In: Princípios de Bioquímica. Editora Guanabara Koogan.
- Wieczorek, M.; Otlewski, J.; Cook, J.; Parks, K.; Leluk, I. & Wilimowskapelc, A. (1985). The squash family of serine proteinase inhibitors. Aminoacids sequences and dissociation equilibrium constants of inhibitors from squash, summer squash, zuochini and cucumber seeds. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **126**: 646-652.
- Wilson, K. A. & Chen, I. C. (1983). Aminoacids sequence of mung bean trypsin inhibitor and its modified forms appearing during germination. **Plant. Physiol.**, **71**: 341-349.
- Wu, C. & 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**: 1583-1589.
- Wu, H.C. & Lin, J.Y. (1993). The complete amino acid sequence of a Kunitz family trypsin inhibitor from seeds of *Acacia confusa*. **J. Biochem.**, **113**: 258-263.
- Xavier-Filho, J. & Campos, F.A.P. (1983). The use of anhydrotrypsin-Sepharose for isolation of trypsin inhibitors from *Vigna unguiculata* seeds. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **16**: 11-15.
- Yamamoto, M.; Hara, S. & Ikenaka, T. (1983). Aminoacids sequences of two trypsin inhibitors from winged bean seeds (*Psophocarpus tetragonolobus*) (L) (DC.). **J. Biochem.**, **94**: 849-863.