

Purificação e caracterização estrutural de um inibidor de  
serinoprotease isolado de sementes de *Cássia*  
*leptophylla*

Fernando Alessandro

OK

USP/IFSC/SBI



8-2-001657

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Física de São  
Carlos, da Universidade de  
São Paulo, para obtenção do  
título de Mestre em Ciências:  
Física Aplicada Opção: Física  
Biomolecular

Orientadora: Profa. Dra. Leila Maria Beltramini

São Carlos – 2005

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA  
INFORMAÇÃO

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Alessandro, Fernando

“Purificação e caracterização estrutural de um inibidor de serinoprotease isolado de sementes de *Cássia leptophylla*.”

Fernando Alessandro – São Carlos, 2005

Dissertação (Mestrado) – Área de Física Aplicada-opção: Física Biomolecular do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo

2005 - Páginas: 69

Orientadora: Profa. Dra. Leila Maria Beltrami

Inibidor de serinoprotease, Kunitz, protease, espectroscopia.

I. Título



MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE FERNANDO ALESSANDRO, APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 12/04/2005.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof.a. Dra. Leila Maria Beltramini(Orientadora e Presidente) – IFSC/USP

Prof. Dr. Richard John Ward – FFCLRP/USP

Prof.a. Dra. Maria Luiza Vilela Oliva – UNIFESP

## **DEDICATÓRIA**

**À minha namorada Renata, pelo amor, paciência, dedicação, estímulo e por deixar meu mundo mais belo.**

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA  
INFORMAÇÃO

## **AGRADECIMENTOS**

À prof.<sup>a</sup> Dra. Leila M. Beltramini, pela orientação deste trabalho, por sua experiência, confiança e estímulo.

À prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Luiza V. Oliva, pelas sugestões, colaboração e por colocar seu laboratório à disposição.

À prof.<sup>a</sup> Dra. Heloisa Sobreiro S. de Araújo, pelo apoio e pela disposição em contribuir com este trabalho.

À prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Paula U. Araújo, pelo apoio e auxílio.

Ao prof. Dr. Jabáh, pelas sugestões e amizade.

Aos professores da pós-graduação do Instituto de Física de São Carlos - USP

Aos técnicos do grupo de Biofísica e Cristalografia: Bel, Bianca, Andressa, Beto e Kelven pelo auxílio no laboratório e pela amizade.

Ao aluno André Luis Coelho, pelo seu auxílio de grande importância para a conclusão deste trabalho.

À Fernanda P. De Caroli, pelo apoio e paciência.

Em especial aos amigos Assuero, Leandro, Marcel, Paulinha, Sheila e Zé pelo apoio e boa amizade.

Aos meus companheiros do grupo de Biofísica e Cristalografia: Alessandra, Cíntia, Cris, Ceará, Daniel, Débora, Elisandra, Fernanda, Gustavo, Marlon e Melissa.

Aos meus amigos Aline, Arthur, Eduardo, Júnior, Sérgio, Lauro, Magno e Nilze.

Aos meus pais, irmãos e à minha avó Francisca.

Ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

**“Genialidade é o resultado de  
longos anos de estudos obsessivos”**

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTAS DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
I – Introdução:	1
I.1 – Proteases	1
I.2 – Inibidores de proteases	4
I.3 – Inibidores de serinoproteases	6
I.3.1 – Família de inibidores Kunitz	7
I.3.2 – Família Bowman–Birk	8
I.3.3 – Família de inibidores do tipo Batata I	9
I.3.4 – Família de inibidores do tipo Batata II	10
I.3.5 – Família de inibidores Abóbora	10
I.4 - <i>Cassia leptophylla</i> , ou Falso–Barbatimão	11
II – Objetivos	13
III – Métodos	14
III. 1 – Purificação da proteína	14
III. 1.1 – Obtenção do extrato bruto	14
III. 1.2 – Cromatografia líquida de exclusão molecular	15

III. 1.3 – Cromatografia de troca iônica	15
III. 2 – Caracterização físico-química da proteína	18
III. 2.1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	18
III. 2.2 – Focalização isoeletrica	18
III.2.3 – Redução, carboximetilação, separação das cadeias e determinação da seqüência N-terminal	19
III. 2.4 – Formação do complexo do inibidor-tripsina	20
III. 2.5 – Quantificação das amostras do inibidor	20
III. 3 – Atividade biológica	21
III. 3.1 – Atividade anticoagulante	21
III. 3.2 – Testes de atividade inibitória de enzimas proteolíticas	22
III. 3.3 – Atividade inibitória do crescimento de fungos fitopatógenos	23
III. 4 – Métodos espectroscópicos	24
III. 4.1 – Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)	24
III. 4.2 – Cálculo das frações de estrutura secundária	29
III. 4.3 – Espectroscopia de fluorescência estática	30
IV – Resultado e Discussão	34
IV. 1 – Obtenção do extrato bruto	34
IV. 2 – Purificação	35
IV. 3 – Caracterização físico-química da proteína	37
IV. 3.1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	37

IV. 3.2 – Focalização isoelétrica	39
IV. 3.3 – Separação das cadeias após redução e alquilação	39
IV. 3.4 – Seqüência N-terminal	41
IV. 3.5 – Formação do complexo inibidor-tripsina	42
IV. 4 – Atividade biológica	43
IV. 4.1 – Atividade anticoagulante	43
IV. 4.2 – Testes de atividade inibitória	43
IV.4.3 – Atividade inibitória do crescimento de fungos fitopatógenos	47
IV. 5 – Aspectos estruturais apresentados pelo CLTI	50
IV. 5.1 – Estabilidade conformacional do inibidor investigada por CD em função do pH	51
IV. 5.2 – Estabilidade conformacional do inibidor investigada por CD em função da temperatura	53
IV. 6 – Fluorescência	56
V – Conclusões e perspectivas	59
VI – Referências bibliográficas	61

**LISTAS DE FIGURAS**

Figura 1. Aspectos de <i>Cassia leptophylla</i> .	12
Figura 2. Fluxograma das etapas do isolamento da proteína de sementes de <i>Cassia leptophylla</i> .	17
Figura 3. Comportamento de um feixe de luz antes e depois de incidir em uma amostra assimétrica.	26
Figura 4. Espectro de CD de cadeias polipeptídicas em diferentes conformações.	28
Figura 5. Espectro de absorção dos três aminoácidos aromáticos.	32
Figura 6. Perfil cromatográfico na coluna de exclusão molecular – Superdex-75.	35
Figura 7. Perfil cromatográfico da coluna de troca iônica – Mono-Q.	36
Figura 8. Perfil recromatográfico da coluna de troca iônica – Mono-Q.	37
Figura 9. Determinação da massa molecular por gel de SDS-PAGE corado com Coomassie Blue R 250.	38
Figura 10. Determinação do ponto isoelétrico do inibidor.	39
Figura 11. Perfil cromatográfico na coluna de fase reversa	40
Figura 12. Seqüência parcial da cadeia- $\beta$ do inibidor de <i>Cassia leptophylla</i> (CLTI- $\beta$ )	41
Figura 13. Filtração em gel do complexo enzima-inibidor em Superdex 200.	42
Figura 14a. Gráfico mostrando a inibição de tripsina por CLTI.	45
Figura 14b. Gráfico mostrando a inibição de quimotripsina por CLTI.	45
Figura 15. Gráfico mostrando a inibição de caliceína plasmática humana por CLTI	46
Figura 16. Atividade antifúngica do inibidor em duplicata usando microplacas de titulação.	48
Figura 17. Teste de inibição do crescimento dos fungos realizados em duplicatas usando microplacas de titulação e diluição seriada da proteína.	48

Figura 18. Espectro de CD do inibidor.	50
Figura 19. Espectros de CD no UV distante do inibidor em diferentes pHs (2,0 a 11,0) em temperatura ambiente.	51
Figura 20. Espectro de CD registrado de 190 a 250nm, acompanhando o efeito da temperatura sobre o inibidor.	54
Figura 21. Curva de transição em função da temperatura do inibidor monitorada no comprimento de onda de 200nm.	55
Figura 22. Os espectros de emissão do inibidor em PBS pH 7,6.	57
Figura 23. Espectro de fluorescência da amostra do inibidor em diferentes ambientes.	58

**LISTAS DE TABELAS**

Tabela 1. As principais enzimas proteolíticas e seus respectivos pontos de clivagem.	2
Tabela 2. As constantes de inibição do CITI e de outros inibidores de tripsina isolados de leguminosas	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
BAPNA (DL-Bz-Arg-pNan)	“N $\alpha$ -benzoil-D arginine 4 nitroanilide hydrochloride”
DMSO	dimetil sulfóxido
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
EB	extrato bruto
HD-Pro-Phe-Arg-pNan	HD-Proline-Phenilaneline-Arginine-4 nitroanilide
HuPK	calicreína plasmática humana
SDS	dodecil sulfato de sódio
Tris	tris-hidroximetil-aminometano
TFA	ácido trifluoracético
C 18 (250 x 4,6 mm)	coluna de fase reversa
Mono-Q HR 5/5	coluna de trocador aniônico
Superdex-75 HR 10/30	coluna de exclusão molecular
Tricina-SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
CD	Dicroísmo Circular
Da	Dalton
DTT	ditiotreitól
g	Aceleração da gravidade (ms <sup>-2</sup> )
HPLC	“high performance liquid chromatography”
kDa	quilo Dalton
K <sub>I</sub>	constante de inibição (constante de dissociação do complexo enzima-inibidor)
NCBI	“National Center for Biotechnology Information”
PPE	elastase pancreática porcina
PBS	“Phosphate Buffer Saline”
pI	ponto isoeletrico
PVPP	polivinilpolipirrolidina
RMS	“Root Meat Square”
rpm	rotações por minuto
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
A <sub>220</sub>	absorbância em 220 nm
A <sub>280</sub>	absorbância em 280 nm
$\mu$ L	microlitro

nm  
nM  
pmol  
 $\mu$ M

nanômetro  
nanomolar  
picomol  
micromolar

## RESUMO

Inibidores de proteases – moléculas capazes de inibir a atividade catalítica de enzimas proteolíticas – compreendem uma das mais abundantes classes de proteínas em plantas. Nas sementes, as funções destas moléculas estão relacionadas com o controle de proteínas endógenas e com mecanismo de defesa contra insetos fitófagos. Este trabalho teve como objetivo isolar, purificar, caracterizar estruturalmente e testar algumas aplicações biotecnológicas de um inibidor de serinoprotease das sementes de *Cassia leptophylla*. Após extração salina, a partir de cotilédones de sementes secas, o inibidor foi purificado por meio de cromatografia de filtração molecular sobre coluna Superdex75 e cromatografia de troca iônica em uma coluna Mono-Q. A proteína purificada apresentou PI de aproximadamente 4,5 e massa molecular estimado por eletroforese (SDS-PAGE) de 20kDa, sendo constituída por duas cadeias polipeptídicas de 16kDa e 4kDa. A seqüência N-terminal da cadeia de 4 kDa (ATEDEKKDLGISIDDCCNRRLVVK) revelou similaridade com outros inibidores de serinoproteases tipo Kunitz isolados de *Adenanthera pavonina*, *Prosopis juliflora* e *Acacia confusa*; o inibidor em estudo foi denominado CLTI (*Cassia leptophylla* trypsin inhibitor). A investigação da seqüência N-terminal da cadeia de 16 kDa, por meio da degradação de Edman automatizada, não deu sinal positivo, indicando provável bloqueio do primeiro resíduo de aminoácido. O espectro de dicroísmo circular (CD) do inibidor revelou que os componentes de estrutura secundária são constituídos predominantemente de folhas- $\beta$ , voltas e estruturas não ordenadas. O espectro de emissão de fluorescência deste inibidor apresentou máximo de emissão em 226 nm, típico de proteínas com os resíduos de triptofano protegidos do solvente. CLTI quando submetido à pHs extremos (ácidos e básicos) revelou alterações de estrutura secundária e foi estável até cerca de 55°C (temperatura de transição 59°C), ambos investigados por CD e emissão de fluorescência. Ensaio de atividade biológica *in vitro* revelaram que CLTI inibiu a coagulação de plasma humano citratado, a ação das enzimas tripsina (KI 1,92nM), quimotripsina (KI 14,5nM), e calicreína plasmática humana (KI 1,5 $\mu$ M), mas não apresentou inibição sobre elastase porcina. CLTI formou um complexo estável com a tripsina demonstrado pela eluição do mesmo em coluna de filtração molecular. Este inibidor também mostrou atividade fungicida sobre as cepas de *Fusarium moniforme* e *Fusarium graminearum* e atividade fungistática sobre as cepas de *Colletotrichum sp.* F37 e *Colletotrichum sp.* P10.

## ABSTRACT

Proteinase inhibitors are molecules able to inhibit the catalytic activity of proteolytic enzymes. They are the most abundant class of plant proteins. The function of these molecules in seeds is related to the control of endogenous proteins and defense mechanisms against phytopathogens. The objectives of this work are the isolation and structural characterization of a serine proteinase inhibitor from seeds of *Cassia leptophylla*. Besides, some biotechnological properties of this inhibitor were tested. After saline extraction from dry seed cotyledons, the inhibitor was purified by gel filtration chromatography on a Superdex75 column and ion exchange chromatography on a Mono-Q column. The purified protein presents a pI of approximately pH 4,5 and 20 kDa molecular mass estimated by electrophoresis (SDS-PAGE). This protein is constituted by two polypeptide chains, one of 16kDa and other of 4kDa. The N-terminal sequence of 4kDa peptide (ATEDEKKDLGISIDDCCNRRLVVK) reveals homology with other Kunitz type serine proteases inhibitors isolated from *Adenantha pavonina*, *Prosopis juliflora* and *Acacia confusa*. The studied inhibitor was named CLTI (*Cassia leptophylla* trypsin inhibitor). N-terminal sequencing of the 16kDa chain, using Edman degradation, did not show positive signal probably indicating blocked amino acid residues. The circular dichroism spectrum (CD) of this inhibitor reveals that the components of the secondary structure are constituted predominantly by  $\beta$  sheets and unordered structures. The fluorescence emission spectrum of this inhibitor presents the maximum emission at 226nm typical of proteins with tryptophan residues solvent inaccessible. CLTI secondary structure was revealed to change at extremely acid and alkaline pHs. It remained stable at temperatures up to 55°C (transition temperature of this protein is 59°C). All these data were investigated by CD and fluorescence emission. Tests of biological activity *in vitro* revealed that CLTI inhibits blood clotting of citrated human plasm. Tests also showed inhibitory activity against trypsin (Ki 1,92nM), chymotrypsin (Ki 14,5nM) and human plasm kallikrein (Ki 1,5  $\mu$ M), but did not present inhibition against porcine pancreatic elastase. CLTI showed to form a stable complex with trypsin when eluted in gel filtration chromatography. This inhibitor also showed fungicide activity against the strains of *Fusarium moniforme* and *Fusarium graminearum*, and fungistatic activity against *Colletotrichum sp.* F37 and *Colletotrichum sp.* P10 strains.

# I – INTRODUÇÃO

## I.1 – PROTEASES

Proteases ou enzimas proteolíticas são moléculas enzimáticas que catalisam a clivagem hidrolítica de ligações peptídicas presentes em substratos protéicos ou peptídicos; esta clivagem resulta em ativação, inativação funcional, proteólise limitada ou na digestão da molécula em questão. As enzimas proteolíticas estão presentes em vários tecidos de animais, plantas e microorganismos [Macedo *et al.*, 2000].

A União Internacional de Bioquímica reconhece cinco grupos de proteases. A classificação é baseada em sua função, especificidade, estrutura tridimensional, comparação dos sítios ativos e mecanismo catalítico [Grozonka, 2001; Powers, 2002].

As proteases são separadas em quatro principais classes de mecanismos enzimáticos e entre estas classes há seis famílias de proteases. Estes grupos são: serinoproteases I e II, cisteinoprotease, asparticoprotease e metaloprotease I e II. Cada família tem uma característica comum de resíduos de aminoácidos funcionais arranjados numa configuração específica, formando o sítio ativo [Koiwa *et al.*, 1997; Powers *et al.*, 2002].

As serinoproteases são as enzimas proteolíticas mais intensamente estudadas e melhor caracterizadas, incluem moléculas que estão envolvidas em muitos processos fisiológicos tais como: digestão, desenvolvimento, processos inflamatórios, proliferação celular, diferenciação, permeabilidade vascular, reabsorção óssea e coagulação [Powers 2002]. As principais enzimas que constituem o grupo das serinoproteases I são: tripsina, quimotripsina, elastase, calicreína pancreática e trombina; o principal representante das serinoproteases II é a subtilisina [Dunn, 1989; Neurath, 1989].

O sítio ativo das serinoproteases I é formado pelos resíduos Asp102, Ser195 e His57 (o número do resíduo corresponde à seqüência de aminoácidos da quimotripsina) que estão ligados por pontes de hidrogênio. Estes três resíduos são conhecidos como tríade catalítica e estão envolvidos diretamente com a hidrólise das ligações peptídicas [Bode e Huber, 1992]. As enzimas pertencentes a esta classe apresentam estrutura e mecanismo de ação semelhante, mas clivam ligações adjacentes do grupo carbonil em diferentes resíduos de aminoácidos devido às diferenças estruturais no centro de ligação (tabela 1) [Warshel *et al.*, 1989]. O sítio da serinoprotease II é composto por Asp32, Ser221 e His64 (o número do resíduo corresponde à seqüência de aminoácidos da subtilisina).

Enzimas proteolíticas	Ponto de clivagem
Tripsina	Lisina e arginina
Quimotripsina	Fenilalanina, triptofano e tirosina.
Elastase	Resíduos neutros e pequenos
Trombina	Arginina
Papaína	Arginina e Lisina
Termolisina	Mesmos resíduos que a quimotripsina
Subtilisina	Muito pouco específico
Carboxipeptidase A	C-terminal dos aminoácidos

Tabela 1. As principais enzimas proteolíticas e seus respectivos pontos de clivagem [Valueva e Mosolov, 1999].

As cisteinoproteases estão distribuídas em diversas famílias e podem ser encontradas em bactérias, fungos, protozoários, plantas e mamíferos. Em plantas, estas moléculas representam um grupo de enzimas com propriedades similares, tais como, massa molecular na faixa de 20 a 25kDa e pH ótimo entre 4,2 e 5,1. As principais enzimas proteolíticas deste grupo são: papaína, actinidina e catepsina H, e os resíduos de aminoácidos característicos do centro ativo destas enzimas referentes à seqüência primária da papaína são: Cys25, His159 e Asp158 [Wilimowska-Pelc *et al.*, 1991; Grzonka *et al.*, 2001]. A especificidade da hidrólise da papaína é mostrada na tabela 1. As enzimas proteolíticas da família das cisteinoproteases têm sido isoladas de sementes de *Vigna ssp* (girassol) e também foram isoladas de frutos de mamão

(papáína), figo (ficina) e de abacaxi (bromelaina). As principais funções fisiológicas destas moléculas estão relacionadas ao metabolismo de proteínas e estas enzimas também estão envolvidas em várias patologias [Segundo, 1993].

As famílias das asparticoproteases incluem proteínas de mamíferos, plantas, fungos e de vírus. Em mamíferos, estas enzimas executam funções diversas que variam da digestão de proteínas alimentares a papéis regulatórios específicos. Estas enzimas dependem de ácido aspártico para sua atividade catalítica, contêm dois resíduos de aspartato como característica do seu sítio ativo e normalmente têm pH ótimo na faixa ácida. As principais proteínas que pertencem a este grupo são: a penicilopepsina bacteriana, pepsinas de mamíferos, reninas e catepsinas D e E [Cooper, 2002; Simões & Faro, 2004].

As metaloproteases caracterizam-se pela necessidade de um íon metálico para sua atividade, sendo a maioria dependente de zinco para executar sua função. O mais estudado membro do grupo da metaloprotease I é a carboxipeptidase, enquanto que o representativo da metaloprotease II é a termolisina [Wilimowska-Pele *et al.*, 1991; DeClerck, 2000]. O sítio ativo da metaloprotease I é formado por zinco, glutamina e tirosina e o sítio da metaloprotease II é composto por zinco, glutamina e histidina. A especificidade da hidrólise da carboxipeptidase A e da termolisina é apresentada na tabela 1.

Muitos trabalhos têm mostrado que as proteases estão envolvidas em uma ampla variedade de processos biológicos que são essenciais para a vida, mas elas podem também ser prejudiciais caso não sejam controladas [Laskowski Jr & Quasim 2000]. Para limitar o perigo destas enzimas, sua atividade é estritamente regulada no momento fisiológico e no tecido em que atua.

Há pelo menos três principais mecanismos que regulam a atividade das enzimas proteolíticas. O primeiro envolve o controle da expressão gênica, o segundo envolve sua síntese. Quase todas as proteases são traduzidas como precursoras inativas, chamados de pró-

proteínas ou zimogênios. Estes precursores são armazenados e ativados sobre necessidade fisiológica. As ativações destas moléculas envolvem proteólises de ligações peptídicas ou remoção de aminoácidos N-terminal que causa variações conformacionais que expõem o sítio ativo da molécula. [Laskowski Jr & Quasim, 2000].

O outro mecanismo é baseado no controle das enzimas proteolíticas ativas, isto ocorre por meio de proteínas inibidoras de protease. Os inibidores de protease são proteínas ou peptídeos que compreendem um grupo específico de moléculas que tem a propriedade de produzir um complexo estequiométrico com protease, sendo assim, capazes de inibir a atividade catalítica de enzimas proteolíticas [Valueva e Mosolov, 1999].

## I.2 – INIBIDORES DE PROTEASES

Inibidores de enzimas proteolíticas são amplamente distribuídos em plantas, animais e microorganismos [Birk, 1985]. As sementes e partes vegetais de plantas contêm muitos inibidores de enzimas proteolíticas de insetos, fungos, mamíferos e proteínas endógenas. Estes inibidores têm sido estudados particularmente em Leguminosae, Gramineae e Solanaceae [Konarev *et al.*, 2002] e compõem uma importante parte das proteínas encontradas nos tecidos vegetais. Em sementes de Gramineae e Leguminosae têm sido relatadas altas concentrações de inibidores de protease [Richardson, 1991].

Em plantas, os inibidores de protease representam diversas funções fisiológicas relacionadas com o controle de proteínas endógenas, mecanismo de defesa da planta contra fitófagos e parasitas e também são proteínas de reserva. Os inibidores de proteases nas sementes podem controlar as enzimas proteolíticas durante a dormência e a germinação inibindo-as, prevenindo a hidrólise prematura do material de reserva, controlando assim, a mobilização de proteínas durante estes períodos [Broadway, 1995; Bronse 1990].

Várias características destes inibidores enzimáticos argumentam fortemente seu papel como depósito ou forma segura de estocar proteínas que são imunes à digestão até serem necessárias para a germinação, pois estes inibidores são resistentes à desnaturação por calor, a extremos de pH e à hidrólise de muitas enzimas. O alto conteúdo de cisteína e de cistina encontrado em muitos inibidores de plantas mostra que estes também são moléculas com um considerável valor de estoque de enxofre. [Richardson, 1991; Sampaio *et al.*, 1996].

Os inibidores de proteases fazem parte do sistema químico de defesa da planta, pois podem fazer as sementes ficarem menos palatáveis ou mesmo letais para insetos fitófagos. Estas proteínas, por inibição extracelular de enzimas, podem retardar ou prevenir a invasão de seus tecidos por microrganismos saprófitos ou parasitas tais como fungos e bactérias [Shewry e Lucas, 1997; Moreno e Crispeels, 1999; Franco *et al.*, 2003].

Inibidores enzimáticos têm sido estudados em detalhes por causa de sua aplicação como instrumento de investigação do mecanismo enzimático e pelo desenvolvimento de drogas para o tratamento de uma ampla série de patologias tais como: pancreatite, coagulação, alergia, inflamação e certos cânceres [Declerck *et al.*, 1994; Oliva *et al.*, 2000]. Extensivas investigações de inibidores de protease como agentes preventivos de câncer têm sido conduzidos por inúmeros estudos que têm mostrado que inibidores de tripsina suprimem dois estágios da carcinogênese em câncer do pulmão e em cultura de células em estudos animais [DeClerk *et al.*, 1994; Kenndey, 1998].

Exemplos clássicos do sucesso clínico de inibidores de protease são os inibidores de tripsina pancreática bovina tipo Kunitz para o tratamento de pancreatite e o anticoagulante isolado do *Hirudo medicinalis* [Schneberli e Braun, 1986]. Evidências epidemiológicas têm mostrado também que os inibidores de protease diminuem a incidência dos principais cânceres em humanos em população que consome alimentos que contenham estes inibidores [Huang *et al.*, 1999].

Outro interesse por estas moléculas é identificar inibidores de protease com uma forte atividade sobre enzimas de insetos predadores e patógenos com o objetivo de serem utilizadas em plantas transgênicas, aumentando assim, a resistência destas aos ataques de pragas [Koiwa *et al.*, 1998].

A regulação da atividade proteolítica por inibidores de proteinases é um processo comum na natureza. Inibidores ligam-se fortemente ao sítio ativo das proteinases por meio de uma pequena porção da superfície da molécula denominada sítio reativo ou sítio inibitório. Esta ligação ocorre de modo semelhante ao da ligação do substrato. A inibição decorre da não ligação do substrato à protease devido ao impedimento estereoquímico provocado pela ligação do inibidor à enzima [Laskowski Jr. & Kato, 1980; Bode & Huber, 1992; Bieth, 1995; Garcia-Carreño, 1996].

Inibidores de protease são primariamente classificados de acordo com a classe de protease que estas moléculas inibem, portanto são agrupados em quatro principais classes de inibidores: asparticoprotease, metaloprotease, cisteinoprotease e serinoprotease [Bode & Huber, 1992]. A seguir, serão apresentados alguns aspectos sobre inibidores de serinoproteases, uma vez que o presente trabalho trata da caracterização de um inibidor deste grupo.

### I.3 – INIBIDORES DE SERINOPROTEASES

Os inibidores de serinoproteases isolados de sementes e tecidos vegetais são os mais bem estudados e caracterizados [Apostoluk e Otlewski, 1998]. Todas as proteínas desta classe são inibidores competitivos que inibem proteases com um mecanismo de padrão similar [Laskowski Jr & Quasim, 2000]. Estes inibidores são as principais proteínas regulatórias e de defesa das plantas e se acumulam durante a maturação nas sementes ou nos bulbos.

1755-0

Esta classe compreende moléculas entre 29 a 200 resíduos de aminoácidos que apresentam alta estabilidade e possuem uma alça hidrofóbica de conformação característica [Bode *et al.*; 1992].

Os inibidores de serinoprotease de origem vegetal podem ser agrupados em famílias distintas, de acordo com a homologia na estrutura primária, a posição dos sítios reativos e as pontes dissulfeto [Laskowski Jr & Quasin, 2000]. As famílias melhores caracterizadas são: Kunitz, Bowman-Birk, Batata I, Batata II e Abóbora.

### **I.3.1 – Família de inibidores Kunitz**

Este tipo de inibidor, isolado inicialmente em *Glycine max*, é encontrado em inúmeras leguminosas como *Enterolobium contortisiliquum* e *Swartzia pickellii* [Batista, 1996; Calvalcanti, 1994]. Estes inibidores contêm de 170 a 200 resíduos com massa molecular de aproximadamente 21 a 22kDa, possuindo uma ou duas cadeias polipeptídicas e, em geral, apresentam quatro resíduos de cisteína que formam duas pontes dissulfeto (Cys39–Cys85 e Cys136–Cys145, de acordo com a seqüência do inibidor de tripsina de soja) [Richardson, 1991; Batista, 1996; Oliva, 2000]. Entretanto, dois isoinibidores de subtilisina de sementes de *Canavalia lineata* contêm cinco resíduos de cisteína, sendo quatro envolvidos em pontes dissulfeto e um livre [Laskowski Jr. e Kato, 1980; Shibata *et al.*, 1986].

Recentemente foi descoberto um inibidor, a partir de semente de *Copaifera langsdorffii* (Leguminosae, Caesalpinioideae), formado por duas cadeias polipeptídicas, uma com 11 kDa e outra com 9 kDa. [Silva, 2001; Krauchenco, 2003].

Os inibidores de serinoprotease tipo Kunitz são comuns em sementes e em outras partes da planta, sendo principalmente encontrados em sementes de três subfamílias de leguminosae:

Mimosoideae, Caesalpinoideae e Papilionoideae [Richardson, 1977]. Estes inibidores agem na agregação de plaquetas, coagulação sanguínea, inflamação entre outros.

A estrutura primária completa do inibidor de protease tipo Kunitz de soja foi a primeira a ser descrita [Koide and Ikenaka 1973]. A análise da estrutura cristalina deste inibidor revelou ausência de hélices- $\alpha$ , sendo formado principalmente por folhas- $\beta$  e estruturas desordenadas. A estrutura secundária de outros inibidores tipo Kunitz, tal como o inibidor de quimotripsina isolado de *Schizolobium parahyba*, também é formada principalmente de folhas- $\beta$  e estruturas desordenadas [Teles *et al.*, 2004].

A seqüência N-terminal tem mostrado vários outros inibidores Kunitz isolados de sementes de leguminosas tais como: *Bauhinia bauhinioides* [Oliva *et al.*, 2001], *Dimorphandra mollis* [Mello *et al.*, 2001], *Dioclea glabra* [Bueno *et al.*, 1999]. Enquanto que a maioria destes inibidores possui cadeia molecular única; outros, isolados de sementes de Mimosoideae (Acácia e Adenantha), são compostos por uma grande cadeia- $\alpha$  de aproximadamente 16kDa e uma pequena cadeia- $\beta$  ao redor de 5kDa ligadas por uma ponte dissulfeto.

A localização da ligação peptídica do sítio reativo tem sido determinada em vários inibidores Kunitz isolados de sementes. Este sítio está sempre em posição homóloga à ligação Arg(63)-Ile(64); o número do resíduo corresponde à seqüência de aminoácidos dos inibidores encontrados em soja [Richardson, 1991].

### **I.3.2 – Família Bowman–Birk**

Os primeiros inibidores de enzima de sementes a ter seqüência de aminoácidos determinada foram chamados de inibidores de protease Bowman–Birk. Os inibidores isolados de fava de *Phaseolus lunatum* [Tan e Stevens, 1971] e de soja *Glycine max* [Odani e Ikenaka,

1972] foram os primeiros desta família a ter sua seqüência determinada. Este grupo de molécula é amplamente distribuído em sementes de Leguminosae; outras seqüências de aminoácidos homólogas a esta família têm sido encontradas em inibidores isolados de *Arachis hypogaea* [Norioka e Ikenata, 1983], *Vigna angularis* [Ishikawa *et al.*, 1985], *Vigna unguiculata* [Morhy e Ventura, 1987].

Os inibidores do tipo Bowman-Birk são moléculas constituídas por uma cadeia polipeptídica que é caracterizada pela massa molecular em torno de 8 a 10 kDa e alto conteúdo de resíduos de cisteína formando 7 pontes dissulfeto. Os inibidores dessa família têm forte tendência para formarem dímeros; geralmente apresentam dois sítios reativos em cada molécula. São inibidores capazes de formar complexos de 1:1 com diferentes proteases ou com duas moléculas da mesma enzima em sítios reativos independentes que se localizam em região homóloga [Laskowski Jr. e Kato, 1980; Birk, 1985]. A presença de pontes dissulfeto aumenta a atividade inibidora destas moléculas e também parece protegê-las contra proteólises.

Estas proteínas inibem a plasmina humana, a quimotripsina, a tripsina e raramente a elastase [Laskowki Jr. e Kato, 1980]; alguns inibidores desta família possuem propriedades anticarcinogênicas [Kennedy, 1998].

### **I.3.3 – Família de inibidores do tipo Batata I**

A família Batata I envolve todas aquelas seqüências que mostram alto nível de homologia com o inibidor de quimotripsina 1 isolado de tubérculos de batatas [Richardson 1991]. As proteínas desta família são fortes inibidoras de quimotripsina, subtilisina e, em alguma extensão, tripsina.

Os inibidores da família Batata I são proteínas oligoméricas com massa molecular de 41kDa, apresentando cinco monômeros de 8 kDa cada. Estes monômeros são constituídos de 70 a 71 resíduos de aminoácidos e uma ponte dissulfeto. A ligação peptídica do sítio reativo tem sido identificada como Met/Leu-Asp [Richardson 1991].

Todos os inibidores isolados das plantas desta família mostram uma surpreendente homologia com inibidores de animais [Seemulher *et al.*, 1980]. Assim, a família de inibidores de Batata I é atualmente uma das maiores famílias conhecidas, com exemplos em Solanaceae, Gramineae, Leguminoseae, Polygonaceae, Curcubitaceae e em animais.

#### **I.3.4 – Família de inibidores do tipo Batata II**

O primeiro membro da família de inibidores Batata II que teve sua seqüência de aminoácidos determinada foi o inibidor de tripsina de *Solanum melongena*. A ligação peptídica do sítio reativo deste inibidor foi identificada na posição Arg(38)-Asn(39) (Richardson 1991), sendo também encontrada em regiões homólogas ao inibidor de tripsina Batata I, enquanto que o inibidor quimotrópico Batata I e o inibidor Batata II contêm Leu-Asn e Phe-Asn, respectivamente, que são inteiramente consistentes com suas especificidades [Hass *et al.*, 1982; Graham *et al.*, 1985].

#### **I.3.5 – Família de inibidores Squash**

Os inibidores da família Squash são proteínas de baixa massa molecular e são isolados de sementes da família Cucurbitaceae [Favel *et al.*, 1989; Otlewski *et al.*, 1987]. Estas moléculas são potentes inibidores de tripsina, calicreína e fator XIa, Xa e XIa [Wieczorek *et al.*, 1985].

As proteínas desta família são constituídas de 29 a 32 resíduos, três pontes dissulfeto Cys(3)–Cys(10), Cys(16)–Cys(28) e Cys(20)–Cys(22) e um sítio reativo que contém ligações peptídicas Arg(5)–Ile(6) ou Lys(5)–Ile(6); todas estas seqüências são correspondentes ao inibidor de tripsina de *Curcubita máxima* [Laskowski Jr. & Kato, 1980].

#### I.4 – *Cassia leptophylla* OU FALSO-BARBATIMÃO

O inibidor estudado neste trabalho foi extraído de sementes de *Cassia leptophylla*, uma planta que pertence à família das Leguminosae, subfamília Caesalpinoideae; seus nomes populares são: falso-barbatimão e canafistula. Apresenta origem e ocorrência no Brasil, nos estados do Paraná e Santa Catarina, nas florestas de araucárias.

Esta planta de folhas perenes tem de 8 a 10 metros de altura e tronco com 30-40 cm de diâmetro, suas folhas são compostas de 8 a 12 pares de folíolos pontiagudos na extremidade. Floresce em buquês de flores amarelas na ponta dos ramos, nos meses de novembro a janeiro. Os frutos em favas amadurecem no período de junho a julho [Lorenzi, 1992]. A figura 1 ilustra alguns dos aspectos desta planta:

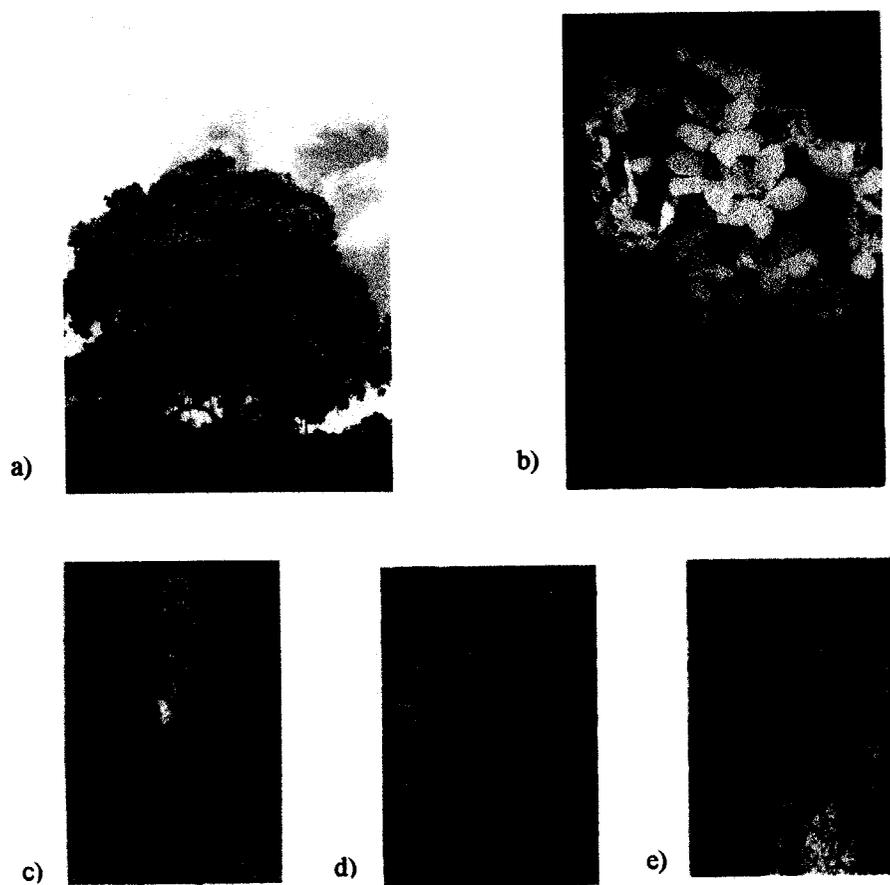


Fig. 1. Aspectos de *Cassia leptophylla*; (a) árvore, (b) flor e folhas, (c) favas maduras, (d) sementes e (e) casca [Lorenzi, 1992].

Plantas do gênero *Cassia* apresentam atividades antioxidante [Manonmani *et al.*, 2005], larvicida [Yang, 2003], antiinflamatória [Moriyama, 2003a], antiplasmodial [Adzu, 2003], bem como propriedades antifúngicas [Kim *et al.*, 2004] e inibição da coagulação sanguínea [Moriyama, 2003b].

## II – OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a presença de lectinas e/ou inibidores de proteases presentes nas sementes de *Cassia leptophylla*. As sementes de leguminosas contêm vários inibidores de proteases, além de lectinas que participam de inúmeros processos fisiológicos na planta e também podem ser utilizadas como drogas ou ferramentas biotecnológicas.

Especificamente, os seguintes objetivos foram cumpridos neste trabalho:

- 1) Investigação da presença de lectinas e/ou inibidores de proteases no extrato salino das sementes de *Cassia leptophylla*;
- 2) Purificação de uma proteína com atividade anticoagulante e inibitória sobre tripsina presente no extrato;
- 3) Estudo das propriedades físico-químicas e estruturais por métodos espectroscópicos, bem como sua estabilidade em função do pH e temperatura;
- 4) Determinação da atividade inibitória desta proteína sobre diferentes serinoproteases;
- 5) Estudo da ação antimicrobiana do inibidor.

### III – MÉTODOS

#### III. 1 – PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA

##### III. 1.1 – Obtenção do extrato bruto

O processo de extração do inibidor de protease presente em sementes de *Cassia leptophylla* foi preparado de acordo com o procedimento que se segue. Normalmente, 30g de cotilédones foram retirados de sementes secas e manualmente moídos até a obtenção de uma farinha, subseqüentemente desengordurada com acetona (1:5 p/v) por 12 horas. Depois, o solvente orgânico foi removido por filtração, por meio de um filtro e o material foi colocado para secar em temperatura ambiente.

A farinha seca foi suspensa em solução salina tamponada (PBS), pH 7,4 (1:10m/v), sob agitação, por 2 horas, a 4°C. A seguir, foi centrifugada a 2000g por 20 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi novamente suspenso, sob agitação em PBS contendo polivinilpolipirrolidina (PVPP) sólido (10:1 v/p), por 2 horas, a mesma temperatura, para remover compostos fenólicos. Decorrido este período, a solução foi centrifugada nas condições acima citadas, o sobrenadante foi dialisado em PBS por 24 horas a 4°C e foi denominado extrato bruto (EB). Este foi armazenado a 4°C e, posteriormente, submetido aos processos de fracionamento descritos a seguir.



uma recromatografia na coluna Mono-Q, equilibrada nas condições anteriores e eluída com gradiente linear de NaCl mais lento (0 – 0,5M), em 65 minutos. A figura 2 representa um fluxograma das etapas de purificação do inibidor de sementes de *Cassia leptophylla*.

Depois da recromatografia, a fração 18 apresentou atividade anticoagulante e residual sobre tripsina. Esta amostra foi analisada por eletroforese (SDS – PAGE), caracterizada por dicroísmo circular e fluorescência; e sua atividade biológica investigada pela determinação do  $K_i$  sobre quatro serinoproteases e sua atividade antifúngica testada sobre quatro cepas de fitopatógenos.

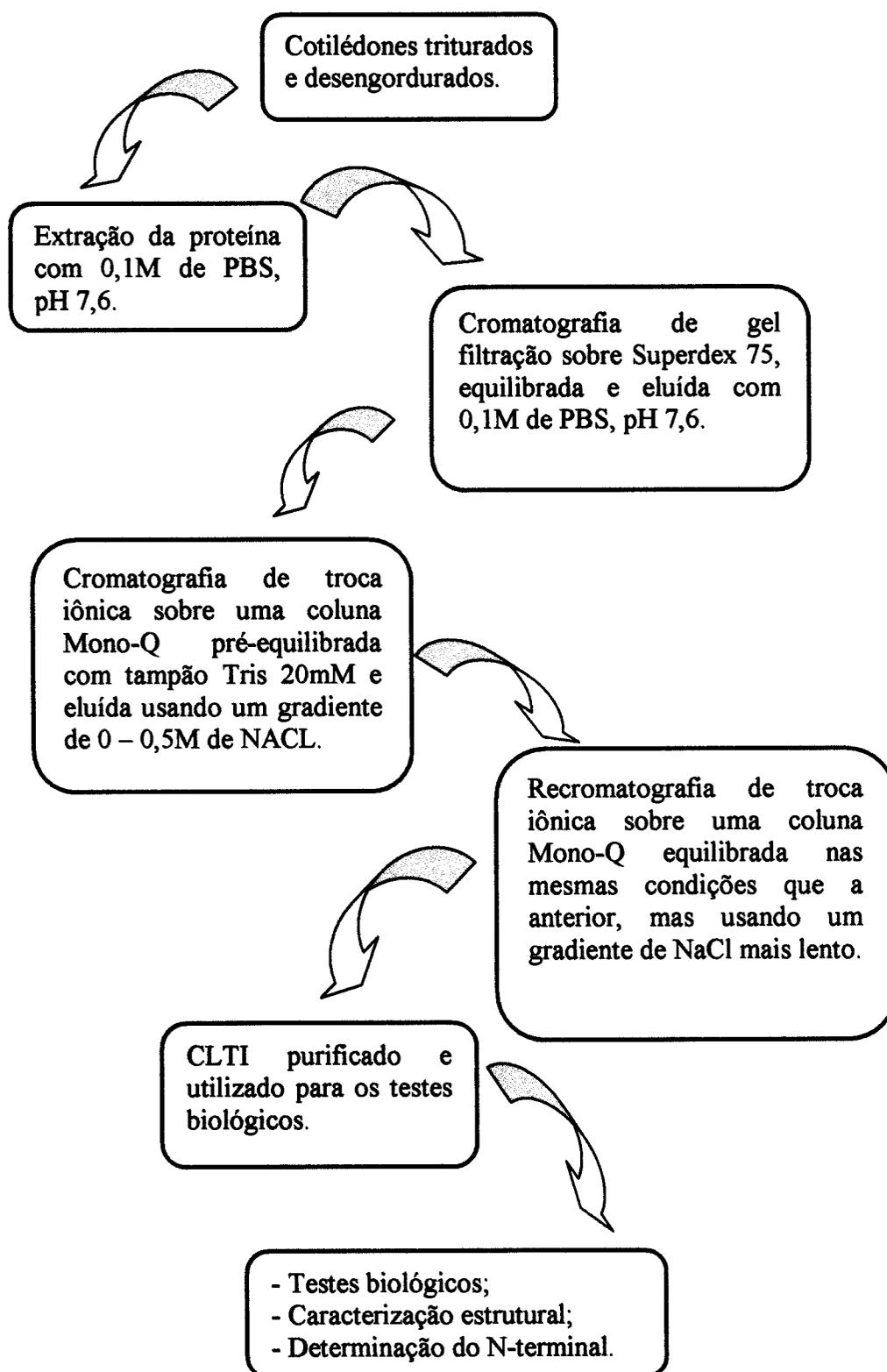


Fig. 2. Fluxograma das etapas do isolamento da proteína de sementes de *Cassia leptophylla*, que apresenta atividades anticoagulante e ação inibidora sobre tripsina.

## III. 2 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA PROTEÍNA

### III. 2.1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 16% de acordo com o método de Laemmli (1970) foi usada com o objetivo de investigar o processo de purificação e estimar a massa molecular do inibidor.

As proteínas utilizadas como padrões de massa molecular foram: albumina de soro bovino (66kDa), ovoalbumina (45kDa), anidrase carbônica (29kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1kDa) e citocromo C (12,4kDa). As amostras contendo de 40 a 100 $\mu$ g de proteína, obtidas dos passos cromatográficos, foram submetidas à eletroforese em condições desnaturantes e redutoras ( $\beta$ -mercaptoetanol).

A corrida eletroforética foi realizada em tampão Tris-HCl 25 mM contendo glicina 0,18M e SDS 0,1% (p/v), durante um tempo de aproximadamente 3 horas, sob uma tensão de 100V e corrente de 30mA. Após a corrida, as bandas foram detectadas no gel por meio do corante Coomassie Brilliant Blue R-250; em seguida, o gel foi descorado com solução de ácido acético 7%.

### III. 2.2 – Focalização isoeétrica

O ponto isoeétrico do inibidor foi determinado com auxílio do sistema PhastSystem (GE Healthcare) com o meio de separação PhastGel IEF, utilizando 12 $\mu$ g da proteína. Soluções anfólicas carregadas (40% v/v) cobrindo uma faixa de pH 3,5 a 9,3 foram utilizadas e a calibração foi feita de acordo com as instruções do fabricante. O gel foi corado com Coomassie Blue G -250.

### III. 2. 3 – Redução, carboximetilação, separação das cadeias e determinação da seqüência N-terminal

Os processos de redução e carboximetilação do inibidor foram realizados como descrito abaixo. O inibidor (2 nM) foi dissolvido em 200µl de tampão Tris-HCl 0,25M pH 8,0, 2mM de EDTA, 6M de uréia, com 45mM de DTT. O nitrogênio foi borbulhado na reação que foi incubada em banho-maria por 4 horas a 37 °C. Após este período, foram adicionados à reação 5µl de 4-vinil-piridina sendo novamente incubada nas mesmas condições anteriores por um tempo de 3 horas.

Depois do processo de redução e carboximetilação, a separação das duas cadeias foi realizada por cromatografia de fase reversa, em coluna C 18 (Waters 250 x 4,6mm), acoplada a um sistema HPLC (Bio Rad). A coluna foi previamente equilibrada com 90% de solvente A (H<sub>2</sub>O + 0,1% de TFA) e 10% de solvente B (90% de acetonitrila + 10% de água + 0,1% de TFA). A amostra foi aplicada na coluna com fluxo de 1mL/min e eluída com gradiente linear do solvente B (de 10% a 80%). A eluição foi monitorada pela absorbância em 220nm.

A seqüência N-terminal das cadeias do inibidor foi determinada pela técnica de degradação de Edman, em um seqüenciador automático Shimadzu (modelo PPSQ-23A), pela professora Dra. Heloísa Sobreiro S. de Araújo, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Carlos. A seqüência obtida foi submetida ao sistema de busca NCBI-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Disponível em: [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>] utilizado para encontrar seqüências homólogas à da proteína em estudo. O alinhamento automático entre seqüências encontradas e o inibidor foi realizado usando Clustal X. Disponível em: [<http://clustalw.genome.jp>].

### III. 2.4 – Formação do complexo do inibidor-tripsina

O inibidor foi incubado com tripsina em excesso molar, em tampão Tris-HCl 50mM, CaCl<sub>2</sub> 0,02% pH 8,0 por 20 minutos, a 37°C. Após este tempo, a mistura de proteínas foi submetida a uma coluna de gel filtração Superdex 200, com 30 mL de resina (30cm x 1cm) que foi equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl pH 8,0 contendo 0,1M de NaCl. O perfil da eluição foi monitorado por meio da absorbância em 280nm.

Os padrões de massa molecular utilizados para calibrar a coluna foram: miosina (205kDa), β-galactosidase (116kDa), BSA (66kDa), anidrase carbônica (30kDa) e citocromo C (12,4kDa).

### III. 2.5 – Quantificação das amostras do inibidor

A determinação quantitativa das concentrações das amostras do inibidor em solução foi realizada por meio do coeficiente de extinção molar desta proteína, utilizando uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA), com valores compreendidos entre 0 e 500µg. O coeficiente foi obtido a partir de dados experimentais de acordo com o método de Lowry (1951). Este método baseia-se na reação colorimétrica, que envolve oxidação catalisada por cobre, dos aminoácidos aromáticos da proteína com o reagente fenol em condições alcalinas.

Para o teste de quantificação, a solução de 1mL do inibidor foi incubada por 10 minutos, em temperatura ambiente, com 5mL de solução alcalina de cobre. Esta solução é composta por: 5mL de sulfato de cobre a 0,5% (p/v) em citrato de carbonato de sódio a 2% (p/v) em hidróxido de sódio a 0,1% (p/v). Após este período de incubação foi adicionado 0,5mL do reagente de Folin-Ciocalteu, diluído 1:1 com água miliQ e depois de 30 minutos foi medida a absorbância em 750nm.

Durante toda a parte experimental, o coeficiente de extinção molar obtido pelo método de Lowry foi utilizado para determinar a concentração da amostra em solução por meio da leitura espectrofotométrica a 280nm.

### III. 3 – ATIVIDADE BIOLÓGICA

#### III. 3.1 – Atividade anticoagulante

A capacidade do inibidor de protease em afetar a coagulação sanguínea foi testada usando plasma sanguíneo humano com citrato. O sangue foi coletado de doadores saudáveis e homogeneizado com citrato de Sódio 15mM (100µl/mL) e centrifugado em 300g por 10 minutos em temperatura ambiente.

O tempo de coagulação foi testado de acordo com os procedimentos convencionais. Um volume de 100µl de plasma foi incubado a 37°C durante 30 minutos com um volume equivalente do inibidor (1mg/mL) em tampão Tris-HCl 0,2M pH 8,0. Depois deste período, foi adicionado 100µl de CaCl<sub>2</sub> a 0,02M.

Este teste foi realizado na presença e na ausência do inibidor, utilizando como controle o plasma sanguíneo e tampão Tris-HCl 0,2M pH 8. Após 3 minutos, tempo necessário para ocorrer a coagulação do controle, o tempo de atividade anticoagulante foi monitorado a cada três minutos.

### III. 3.2 – Testes de atividade inibitória de enzimas proteolíticas

A atividade inibitória foi estimada por meio da redução da atividade proteolítica da enzima sobre o seu substrato na presença da proteína isolada das sementes de *Cassia leptophylla*. Os seguintes substratos sintéticos foram usados para os testes: Bz-Arg-pNA para tripsina bovina; Suc-Phe-pNa para quimotripsina; HD-Pro-Phe-Arg-pNa para caliceína plasmática humana (HuPK); e Suc-Ala-Ala-Ala-pNa, substrato para elastase pancreática de porcina (PPE).

Para os ensaios de atividade enzimática da tripsina, foram incubados a 37°C por 10 minutos 25µl desta enzima (0,43µM) com diferentes concentrações do inibidor em tampão Tris-HCl 50mM, CaCl<sub>2</sub> 0,02% (v/v) contendo 0,15 M de NaCl pH 8,0. Depois deste tempo, foram adicionados nos ensaios 30µl do substrato da enzima (10mM), em um volume final de 250µl, prosseguindo-se a reação por 20 minutos a 37°C.

Para determinar a atividade inibidora da amostra sobre quimotripsina foram incubados a 37°C 25µl desta enzima (0,79µM) com diferentes concentrações do inibidor em tampão Tris-HCl 50mM, CaCl<sub>2</sub> 0,02% (v/v) contendo 0,15 M de NaCl pH 8,0. Depois de 10 minutos, foram adicionados aos ensaios 30µl do substrato da quimotripsina (10mM), em um volume final de 250µl, continuando a reação por 20 minutos incubada na mesma temperatura.

Para determinar a atividade inibidora da amostra em estudo sobre HuPK o seguinte procedimento foi realizado: um volume 20µl desta enzima (0,17µM) foi incubado a 37°C por 10 minutos com diferentes concentrações do inibidor em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0. Após o término deste tempo, foram adicionados à reação mais 30µl do seu substrato (2mM), em um volume final de 250µl, prosseguindo-se a reação por mais 20 minutos nas mesmas condições.

As seguintes etapas foram realizadas para os ensaios de atividade enzimática do PPE a fim de determinar a atividade inibidora do CLTI sobre esta enzima. O PPE em um volume de 20µl (0,8µM) foi incubado a 37°C com diferentes concentrações do inibidor em tampão Tris-HCl 0,1M, 0,5M de NaCl pH 8,0. Após 10 minutos, foram adicionados aos ensaios 20µl do seu substrato (16mM) em um volume final de 250µl, prosseguindo a reação por mais 20 minutos a 37°C.

Em todos estes ensaios as dosagens foram realizadas em microplacas de titulação e após o último período de incubação as reações foram interrompidas pela adição de 40µl de ácido acético 40% (v/v).

A atividade inibidora foi calculada pela atividade residual da enzima na presença e ausência do inibidor por meio de medidas de emissão de fluorescência. A excitação foi em 380nm e a emissão a 460nm em um espectroflorímetro Packard (modelo FluoroCount). A determinação das constantes de dissociação ( $K_i$ ) foi realizada seguindo o procedimento de Morrison; para os cálculos deste modelo foi utilizado o programa de cinética enzimática Grafit® [Knight, 1986].

### III. 3.3 – Atividade inibitória do crescimento de fungos fitopatógenos

A atividade antifúngica foi observada colocando o inibidor de *Cassia leptophylla* na presença de esporos dos *Colletotrichum sp.* F37, *Colletotrichum sp.* P10, *Fusarium moniforme* e *Fusarium graminearum*.

O ensaio foi desenvolvido como descrito a seguir: os testes de inibição foram realizados adicionando-se 100µl de proteína (0,5 mg/mL) em uma solução contendo  $1 \times 10^7$  esporos/mL e meio PD (dextrose de batata, volume final de 200 µl) numa microplaca de 96 poços, procedendo-se então uma diluição seriada 1:2. A microplaca foi incubada por 5 dias a 28°C e

a inibição do crescimento micelar foi visualmente avaliada, comparando-se com a microcultura-controle, contendo somente esporos e meio nutritivo.

### III. 4 – MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

#### III. 4.1 – Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

Espectroscopia de dicroísmo circular (CD) [Fasman, 1996] baseia-se na interação diferenciada entre os feixes de luz circularmente polarizados à esquerda e à direita quando atravessam moléculas assimétricas (quirais). Compostos que apresentam estas propriedades são denominados opticamente ativos. Estes feixes quando incidem em compostos opticamente ativos são absorvidos em diferentes graus, pois os compostos quirais apresentam diferentes coeficientes de extinção para a esquerda e direita. Após este feixe atravessar uma amostra assimétrica, a resultante será um feixe polarizado elipticamente (figura 3).

O dicroísmo circular pode ser definido como a diferença entre a absorção das componentes polarizadas à esquerda e à direita ( $\Delta A$ ). Para calcular o  $\Delta A$ , utiliza-se a lei de Beer-Lambert-Bouquer em que  $I_0$  é a intensidade da luz incidente na amostra e  $I$  é a intensidade da luz após passar pela amostra. A absorbância é definida como:

$$A = \log_{10} (I_0/I)$$

Aplicando a lei para ambos os feixes circularmente polarizados à esquerda (e) e à direita (d), temos:

$$A_e = \log_{10} (I_0/I_e) \qquad A_d = \log_{10} (I_0/I_d)$$

Sendo assim,  $\Delta A$  é definido como:

$$\Delta A = A_e - A_d = \log_{10} (I_e/I_d)$$

A absorvância também pode ser descrita em função do caminho óptico ( $l$ ), da concentração ( $c$ ) e da capacidade de absorção dos compostos que é definida como coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ), então:

$$A = \epsilon cl \quad \Delta\epsilon = (1/cl)\Delta A$$

No CD, o feixe plano polarizado é decomposto por um modulador (cristal piezoelétrico) em duas componentes: luz circularmente polarizada à direita (R) e luz circularmente polarizada à esquerda (L). Ao passar pela molécula, os componentes são absorvidos em intensidades diferentes; isto resulta em uma elipse. Quando os vetores campo elétrico das duas componentes circulares estão na mesma direção, sua soma resulta no semi-eixo maior da elipse e, quando estão em direções opostas, sua soma resulta no semi-eixo menor (figura 3). Desta forma, o CD pode ser caracterizado pela razão entre dois semi-eixos, que é a tangente de um ângulo  $\theta$  denominado elipticidade. Como  $\theta$  é sempre um ângulo muito pequeno, a tangente de  $\theta$  pode ser aproximada para  $\theta$ .

Existe uma relação numérica entre  $\Delta A$  e  $\theta$  (em graus), onde  $\theta = 32,98\Delta A$ . Essa relação foi obtida através da equação descrita abaixo:

$$\begin{aligned} \theta \text{ (rad)} &\sim \text{tag}(\theta) = (|E_l| - |E_r|) / (|E_l| + |E_r|) \\ &= [\exp(-A_l/2) - \exp(-A_r/2)] / [\exp(-A_l/2) + \exp(-A_r/2)] \end{aligned}$$

Expandindo as exponenciais, ignorando os termos de menor ordem e convertendo em graus, tem-se:

$$\theta \text{ (graus)} = 180 \times \ln 10 \times \Delta A / 4\pi$$

$$\theta = 32,98 \times \Delta A$$

A elipticidade também tem uma dependência linear com o caminho óptico e com a concentração da solução, em que a elipticidade molar  $[\theta]$  corresponde a:

$$[\theta] = 100\theta/cl, \quad 100 \text{ é um fator de correção das unidades.}$$

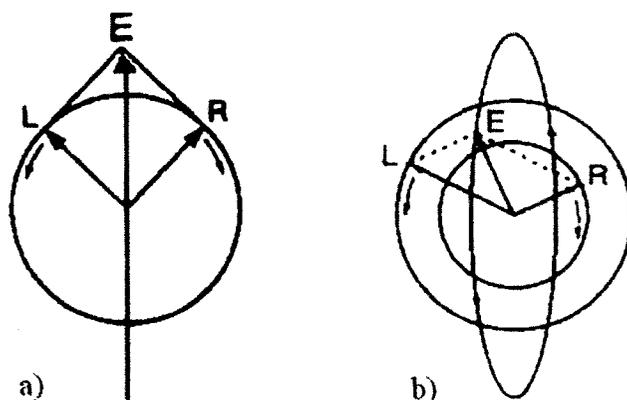


Fig. 3. (a) Luz polarizada linearmente; (E) resultante da luz circularmente polarizada à esquerda (L) e à direita (R) antes de incidir em uma amostra assimétrica. (b) A luz circularmente polarizada à direita (R) e a circularmente polarizada à esquerda (L) interagiu com a amostra diferentemente, resultando na luz polarizada elípticamente (E).

Cromóforos de proteínas são principalmente ligações peptídicas, cadeias laterais de aminoácidos e grupos prostéticos que absorvem radiação eletromagnética na região do ultravioleta. Nas proteínas, as ligações peptídicas possuem assimetria inerente apresentando atividade óptica independente de grupos vizinhos.

Espectros de dicroísmo circular de proteínas exibem bandas na região de 250 a 260 nm e 180 a 250nm que correspondem a pontes dissulfeto e a ligações peptídicas, respectivamente. Transições eletrônicas  $n-\pi^*$  em 210–230 nm e a  $\pi-\pi^*$  em 180–200nm têm sido caracterizadas na faixa de espectro entre 180 a 250nm.

Regiões em que ocorrem transições  $n-\pi^*$  estão relacionadas com a formação de pontes de hidrogênio. Em solventes que possuem poucos doadores de hidrogênio, a banda  $n-\pi^*$  aparece próxima de 230nm, enquanto que, em meio aquoso, a banda é próxima de 210nm. Esta transição é magneticamente permitida ao longo da ligação carbonil.

Transições  $\pi-\pi^*$  são eletricamente permitidas e polarizadas na direção N–O, mas giram  $9,1^\circ$  em direção à ligação C–N. Estas transições em amidas secundárias ocorrem na faixa de 185–190nm; no entanto, em amidas terciárias são observadas ao redor de 200nm.

Os espectros de CD das ligações peptídicas (180–250 nm) podem identificar diferentes tipos de estruturas secundárias tais como: hélices- $\alpha$ , folhas- $\beta$  (paralelas e antiparalelas), voltas- $\beta$  e estruturas desordenadas. Este enfoque é baseado em estruturas secundárias de homopolipeptídios e peptídeos sintéticos.

As estruturas secundárias hélices- $\alpha$  apresentam uma banda negativa na região 222 nm devido às transições  $n-\pi^*$ ; enquanto que a outra banda negativa – com a mesma amplitude na posição 208nm – e a forte banda positiva na posição 192nm ocorrem por causa das transições  $\pi-\pi^*$ .

Em proteínas globulares, a estrutura secundária folha- $\beta$  ocorre no sentido paralelo e antiparalelo. Estudos com homopolipeptídios descrevem que espectros de CD para as folha- $\beta$  antiparalelas são caracterizados por uma banda positiva em 195nm devido à transição  $\pi-\pi^*$  e outra negativa em 216nm com a mesma amplitude, mas a transição  $n-\pi^*$  é que está envolvida.

Estruturas secundárias voltas- $\beta$  apresentam uma conformação na qual a cadeia polipeptídica sofre uma reversão em sua direção. Este tipo de estrutura ocorre em 25% dos resíduos de proteínas globulares e apresenta um importante sinal em espectro de CD. Cálculos teóricos indicam que os tipos I, II e III de volta- $\beta$ , os mais encontrados em proteínas, exibem um espectro de CD que apresenta uma fraca banda negativa próxima de 225nm devido às transições  $n-\pi^*$  e um forte sinal positivo na região de 205nm ( $\pi-\pi^*$ ).

Em proteínas, as estruturas que não apresentam conformação definida são conhecidas como estruturas desordenadas. Investigações teóricas e experimentais destas estruturas em proteínas globulares têm sido realizadas em modelos polipeptídicos. O espectro de CD destes modelos é caracterizado por uma acentuada banda negativa ao redor de 200nm – podendo variar em determinadas condições – e uma fraca banda em torno de 218nm que pode ser positiva ou negativa. O sinal em 218nm pode ou não se apresentar acompanhado de uma

banda negativa próximo de 235nm. A figura 4 mostra os diferentes espectros de CD relacionados com as diferentes conformações polipeptídicas.

CD é um tipo de espectroscopia muito sensível e necessita de pouca quantidade de amostra para realizar as medidas. Por meio do espectro de CD, é possível estimar as frações de estruturas secundárias de proteínas e polipeptídios, monitorar suas transições conformacionais sobre uma variedade de condições tais como pH, temperatura e interações com ligantes.

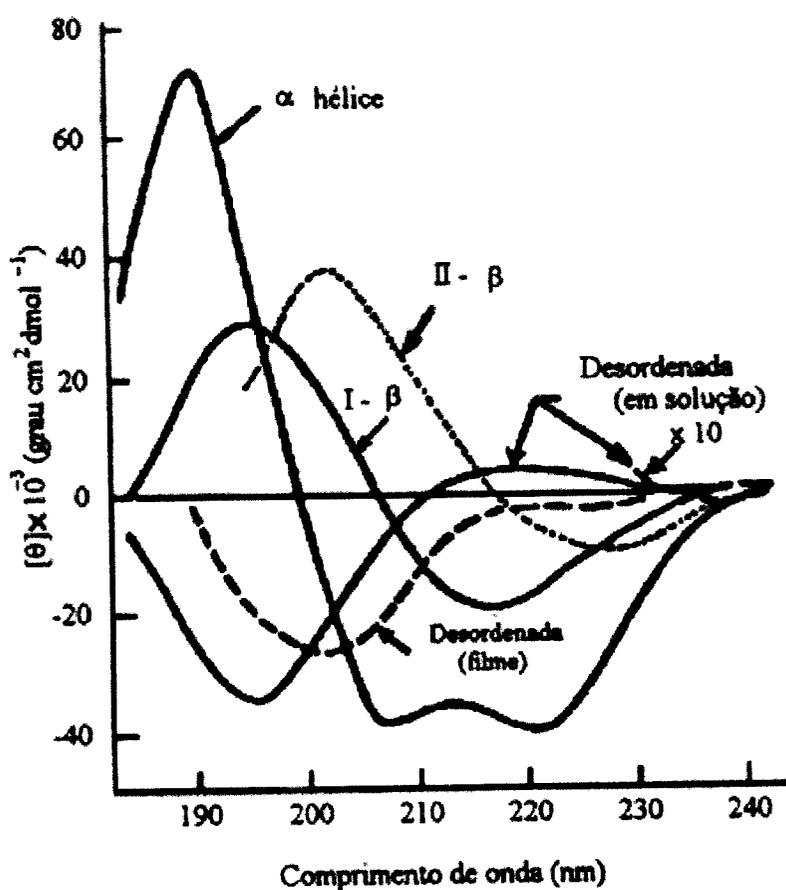


Fig. 4. Espectro de CD de cadeias polipeptídicas em diferentes conformações (Modificado a partir de Kelly & Price, 1997).

### III. 4.2 – Cálculo das frações de estrutura secundária

A análise dos espectros de CD do UV distante de proteínas, baseada em proteínas de referência (moléculas que tenham conformação conhecida), permite estimar as frações de suas estruturas secundárias. Existem vários métodos empíricos para estas análises e todos estes partem de determinadas suposições.

Em geral, estes métodos assumem que as proteínas são combinações lineares de hélices- $\alpha$ , folhas- $\beta$ , voltas- $\beta$  e estruturas desordenadas. Os cálculos para as análises estruturais destas moléculas dependem da escolha das proteínas de referência em concordância com a proteína em estudo e dos tratamentos matemáticos utilizados para a desconvolução do espectro de CD. Os principais programas utilizados para este tratamento são: Selcon 3, Coltin e CDSSTR [Sreerama & Woody, 2000].

As medidas de CD foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-715 (Jasco Corporation, Japão) em cubetas circulares de 1 mm de caminho óptico. As amostras do inibidor utilizadas nestes experimentos estavam concentradas em 0,2mg/mL.

Em todas as medidas, os espectros foram registrados em um intervalo de comprimento de onda de 195 a 250nm, com uma média de 16 varreduras com resolução de 1nm. As contribuições dos tampões foram subtraídas dos seus respectivos espectros e os resultados foram expressos em elipticidade molar ( $[\theta]$ ). Os espectros de CD foram medidos com a amostra em de Tris-HCl 50mM pH 8,0 contendo 150mM de NaCl em temperatura ambiente, com o objetivo de se investigar o envelhecimento da proteína. Os mesmos espectros foram utilizados para calcular as frações de estrutura secundária utilizando os programas Selcon 3, Coltin e CDSSR. As desconvoluções foram feitas utilizando uma base de dados com 48 proteínas.

A estabilidade do inibidor foi investigada por dicroísmo circular em um largo espectro de pH e temperatura. As variações de pH foram na faixa de 2,0 – 11,0 utilizando os tampões acetato-borato-fosfato. Nos estudos de variação de temperatura, as amostras em 50mM de Tris-HCl pH 8,0 contendo 150mM de NaCl foram submetidas a uma variação de temperatura de 25°C a 90°C, em intervalos de 5°C, incubadas por 15 minutos em cada temperatura.

### III. 4.3 – Espectroscopia de fluorescência estática

Espectroscopia de fluorescência é uma importante técnica analítica que envolve dois processos: absorção e emissão. Moléculas são excitadas por absorção de uma radiação eletromagnética e emitem luz em menor frequência do que a da luz incidente. Portanto, a fluorescência pode ser definida como a emissão que resulta do decaimento de um elétron do estado excitado singlete ( $S_1$ ) para o estado singlete fundamental ( $S_0$ ) [Laskowics, 1983].

Há duas grandes vantagens em se utilizar esta técnica nos estudos de sistemas biológicos. A primeira vantagem é a possibilidade de realizar medidas com amostras pouco concentradas e a segunda é a alta sensibilidade da espectroscopia de fluorescência, sendo influenciada por uma série de perturbações e interações, causadas pelo tempo relativamente longo da ordem de ns e  $\mu$ s, em que a molécula investigada permanece no estado excitado. Com esse tempo de vida, a molécula e o meio podem não permanecer estáticos. Assim vários processos podem ocorrer, tais como: reações de protonação e desprotonação de grupos funcionais, reorientação dos cromóforos e variações conformacionais em proteínas devido a alterações na temperatura, pH ou força iônica do solvente.

A dependência da intensidade da fluorescência sobre o comprimento de onda de luz incidente é referida como o espectro de excitação. Este espectro é obtido quando a emissão é monitorada em um único comprimento de onda, enquanto a luz excitadora é variável.

Por outro lado, o espectro de emissão descreve as variações da intensidade da fluorescência em função do comprimento da luz emitida. O espectro de emissão é obtido quando a amostra é excitada em um único comprimento de onda e a intensidade da fluorescência é monitorada em função da luz emitida. A observação das medidas deste espectro é interessante, pois a posição do máximo de emissão do espectro ( $\lambda_{\max}$ ) é sensível à polaridade do ambiente, às reações químicas e à mobilidade do fluoróforo durante o tempo de vida do estado excitado.

A fluorescência é muito sensível ao ambiente ao redor do fluoróforo; esta sensibilidade é causada pelo longo tempo em que a molécula permanece no seu estado excitado singlete até iniciar os processos de decaimento. Durante o tempo em que o estado permanece excitado, vários processos podem ocorrer. Estes processos podem alterar os parâmetros da espectroscopia de fluorescência tais como: máximo comprimento de onda de emissão ( $\lambda_{\max}$ ), rendimento quântico ( $\Phi_F$ ) e tempo de vida do estado excitado ( $\tau_0$ ).

Espectroscopia de fluorescência é um dos mais versáteis e sensíveis métodos para estudos físicos de sistemas protéicos. Medidas de fluorescência nestes sistemas podem ser realizadas em condições diversas tais como: temperatura, viscosidade do solvente, constante dielétrica, associação com outras moléculas e pH.

As proteínas podem apresentar três fluoróforos naturais: fenilalanina, tirosina e triptofano. Os espectros de emissão de fluorescência destes resíduos têm sido utilizados para investigar a desnaturação de proteínas, as transições conformacionais, as reações de associação, as variações causadas pela ligação de substratos, a polaridade do solvente e a orientação e distribuição de ligantes.

Cada aminoácido aromático apresenta duas principais bandas de absorção na região entre 200–300nm. A banda de energia mais baixa ocorre em 258nm para a fenilalanina, 277nm para a tirosina e 280nm para o triptofano (figura 5).

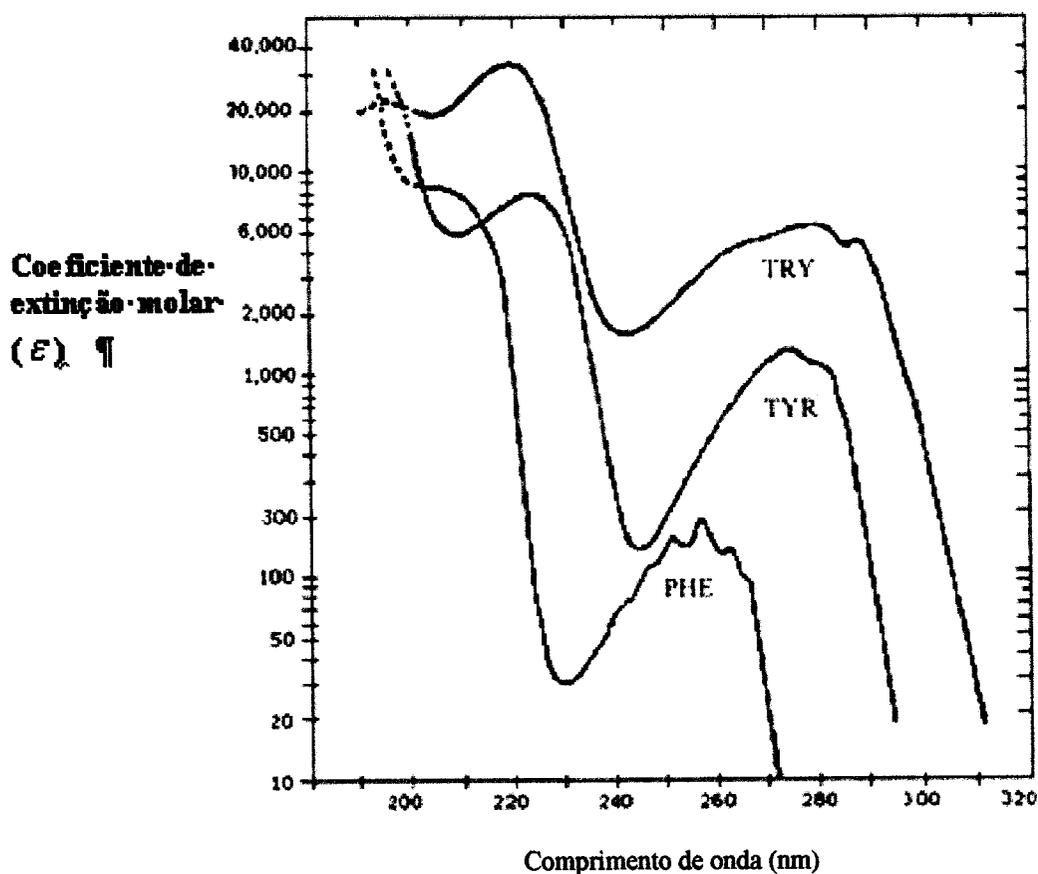


Fig. 5. Espectro de absorção dos três aminoácidos aromáticos [Laskowics, 1983].

As medidas de fluorescência de proteína são realizadas excitando-se os resíduos triptofano e tirosina no máximo de absorção próximo de 280nm ou em comprimento de ondas maiores. Nesta faixa, a fenilalanina não é excitada, além disso, a emissão deste resíduo é raramente observada, pois apresenta um baixo rendimento quântico. Em comprimentos de onda maiores que 295nm, a absorção é devido principalmente ao triptofano de modo que possa ser excitado seletivamente em 295–305nm.

A emissão máxima da tirosina e da fenilalanina é relativamente insensível ao ambiente local e as variações de resíduos vizinhos não têm efeito sobre a intensidade da emissão. Entretanto, a emissão no caso do triptofano é altamente sensível à polaridade do meio ou ao tamanho das moléculas ao seu redor.

A espectroscopia de fluorescência foi utilizada para monitorar possíveis alterações conformacionais do inibidor em função de seu comportamento frente aos diferentes pHs a que foi exposto (2,0 – 11,0).

As medidas de fluorescência foram feitas em um fluorímetro K2 (ISS, fluorescence, Analytical Biomedical Instrumentation – Illinois/USA) a 25°C em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

Amostras do inibidor em PBS pH 7,6 foram excitadas em 280 e 295 nm e a emissão monitorada de 295 a 450nm e 305 a 450nm, respectivamente. Medidas de emissão de fluorescência do inibidor, em tampões com diferentes pHs (tampões acetato-borato-fosfato na faixa de pH de 2,0 a 11,0), foram excitadas em 295nm e a emissão monitorada de 305 a 450nm. As medidas de emissão de fluorescência foram realizadas com as mesmas amostras utilizadas nas medidas de dicroísmo circular, porém apropriadamente preparadas para esta técnica, isto é, foram diluídas ao redor de 0,1mg/mL correspondentes a absorvância de 0,1 em  $\lambda_{280}$ . Os espectros de fluorescência dos tampões foram subtraídos de cada amostra correspondente para minimizar o efeito de espalhamento Raman.

## IV – RESULTADO E DISCUSSÃO

### IV. 1 – OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO

O extrato bruto (EB) foi obtido a partir de cotilédones que foram triturados até pó e suspenso em solução salina tamponada (PBS) 10mM, pH 7,4. Após centrifugação a 12000g, o sobrenadante chamado de EB foi submetido a testes de atividade anticoagulante e atividade inibitória da ação enzimática da tripsina.

Estes experimentos mostraram que o EB de *Cassia leptophylla* contém substância com ação anticoagulante e inibitória sobre a atividade enzimática da tripsina. Vários trabalhos têm mostrado que sementes de leguminosas (*Dimorphandra mollis*, *Leucaena leucocephala*, *Enterolobium contortisiliquum*, por exemplo) contêm inibidores de proteases que interferem na cascata da coagulação sanguínea e inibem enzimas proteolíticas como a tripsina [Batista *et al.*, 1996; Ceciliani *et al.*, 1997; Oliva *et al.*, 2000; Mello *et al.*, 2002], quimotripsina [Batista *et al.*, 1996; Oliva *et al.*, 2000; Teles *et al.*, 2004], calicreína plasmática humana [Batista, *et al.*, 1996; Oliva *et al.*, 2000; Mello *et al.*, 2002]; fator XIIa [Batista., *et al* 1996], plasmina [Oliva *et al.*, 2000; Mello *et al.*, 2002] e papaína [Ryan *et al.*, 1998; Ryan *et al.*, 2003].

Não foi detectado no EB, tratado com PVPP, atividade hemaglutinante, ou seja, indicativo da presença de lectinas, que é uma importante família de proteínas que ligam especificamente a carboidratos. A atividade hemaglutinante observada antes do tratamento com PVPP provavelmente era devido à presença de polifenóis. Assim prosseguiremos o trabalho na expectativa de isolar e caracterizar o inibidor do processo na coagulação.

## IV. 2 – PURIFICAÇÃO

A partir de 30g da farinha de cotilédones, foram obtidos 90 mL de EB, com uma quantidade de proteínas totais de 2200mg. Destas, cerca de 50mg correspondiam à proteína em estudo; o rendimento, portanto, foi de aproximadamente 2,4%. As etapas do procedimento de purificação envolveram: gel filtração sobre coluna de Superdex75, seguido de cromatografia de troca iônica em uma coluna Mono-Q com gradiente de 0,5M de NaCl, recromatografia nas mesmas condições, porém utilizando um gradiente de 0,5M de NaCl mais lento.

O perfil cromatográfico das amostras de EB submetidas à cromatografia de exclusão molecular revelou 6 picos (figura 6). Entretanto, apenas a fração correspondente ao pico 12 apresentou atividade anticoagulante e inibitória sobre tripsina. Esta fração foi concentrada e cromatografada sobre uma coluna de Mono-Q, cujo perfil está ilustrado na figura 7.

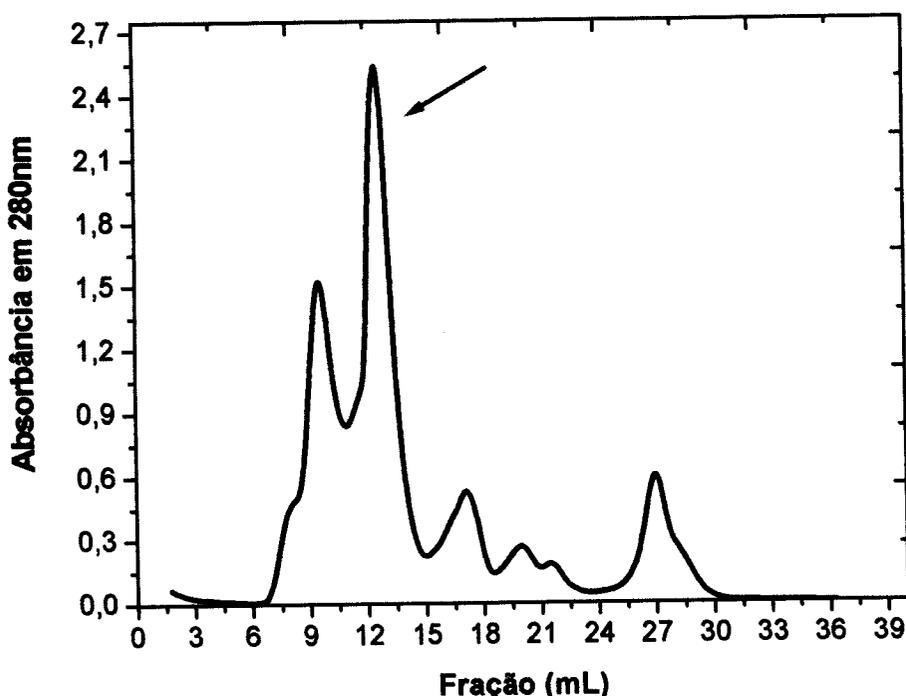


Fig. 6. O extrato bruto das sementes de *Cassia leptophylla* foi submetido a gel filtração em uma coluna de Superdex75. A coluna foi eluída e equilibrada em PBS, pH 7,6. Frações de 1,0 mL foram coletadas com um fluxo de 1,0 mL/min. A flecha aponta para o pico que apresentou ação inibitória sobre tripsina e atividade anticoagulante.

Das duas frações (figura 7), somente a eluída com cerca de 0,3M de NaCl (primeira fração) apresentou ação inibitória sobre tripsina e atividade anticoagulante. As frações correspondentes a este pico foram submetidas à recromatografia, nas mesmas condições, exceto com gradiente mais lento. A recromatografia (figura 8) mostra uma fração majoritária correspondente à proteína de interesse.

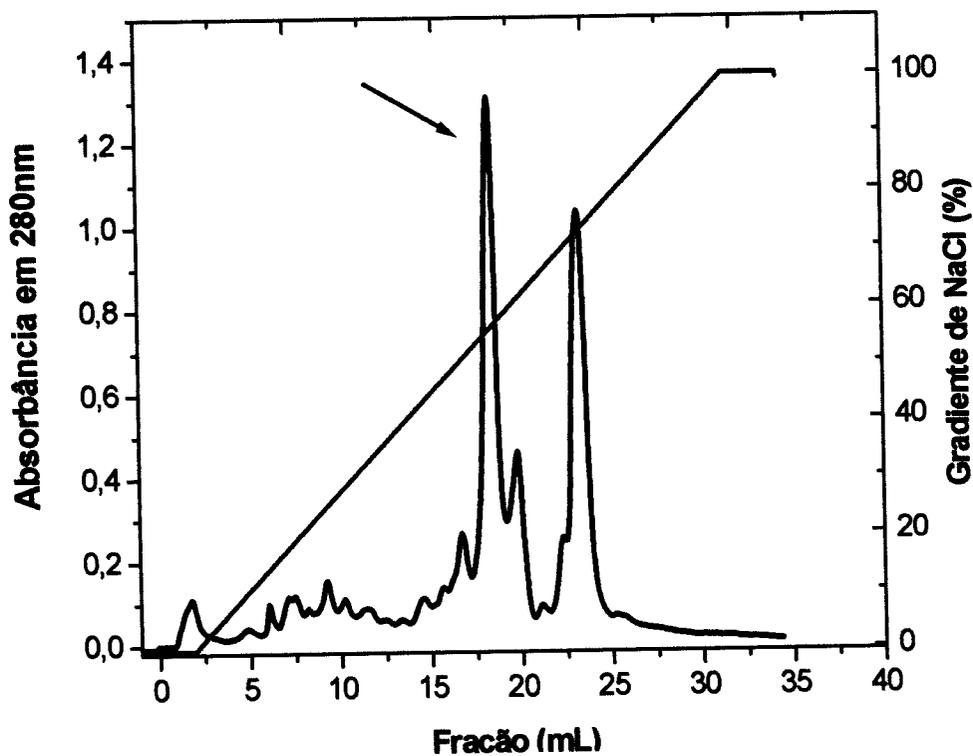


Fig. 7. A fração 12 eluída por gel filtração foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna Mono-Q. A coluna foi equilibrada com tampão tris-HCl 0,02 M, pH 8 e frações de 1,0 mL foram coletadas com um fluxo de 1,0 mL/min. A eluição foi efetuada com gradiente linear de NaCl de 0 – 0,5M. A flecha está indicando o pico que apresentou atividade biológica.

Os procedimentos cromatográficos utilizados para isolar a proteína de interesse foram satisfatórios, pois o inibidor foi purificado em uma forma homogênea como pode ser observado no gel de SDS-PAGE (figura 9). O inibidor foi denominado de CLTI (inibidor de tripsina de *Cassia leptophylla*).

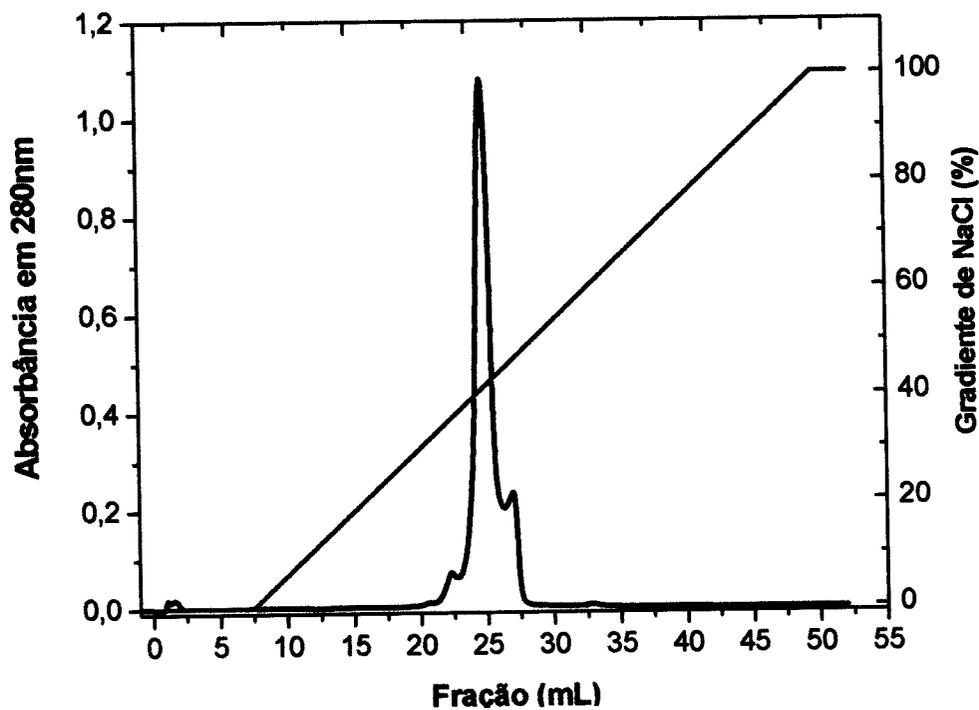


Fig. 8. A fração 18 eluída por Mono-Q foi reunida, concentrada e submetida à recromatografia de troca iônica. A coluna foi equilibrada em tampão Tris-HCl, pH 8,0, frações de 1,0 mL foram coletadas sob um fluxo de 1,0 mL/min. A eluição foi efetuada com gradiente linear de NaCl de 0 – 0,5M.

#### IV. 3 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA PROTEÍNA

##### IV. 3.1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise eletroforética (SDS-PAGE) de frações de diferentes estágios da purificação do inibidor é mostrada na figura 9. No gel, sob condições desnaturantes, as amostras correspondentes ao pico principal eluído por recromatografia em Mono-Q são visualizadas em uma única banda de massa molecular de aproximadamente 20kDa. Depois da redução desta amostra por  $\beta$ -mercaptoetanol, duas bandas de massa molecular estimadas em 16 e 4kDa são reveladas indicando que o inibidor é uma proteína com duas cadeias polipeptídicas, uma cadeia- $\alpha$  de maior massa molecular e uma cadeia- $\beta$  de menor massa molecular. Inúmeros

trabalhos têm isolado inibidores Kunitz compostos por uma cadeia  $\alpha$  maior de 16kDa e por uma cadeia  $\beta$  menor de 5kDa, ligadas por uma ponte dissulfeto [Richardson, 1991; Oliva *et al.*, 2000]. Os valores encontrados (antes e depois da redução) para as massas moleculares aparentes do CLTI estão de acordo com os outros inibidores tipo Kunitz isolados de outras espécies da mesma família [Richardson *et al.*, 1986; Negreiros *et al.*, 1991; Macedo *et al.*, 2000; Oliva *et al.*, 2000].

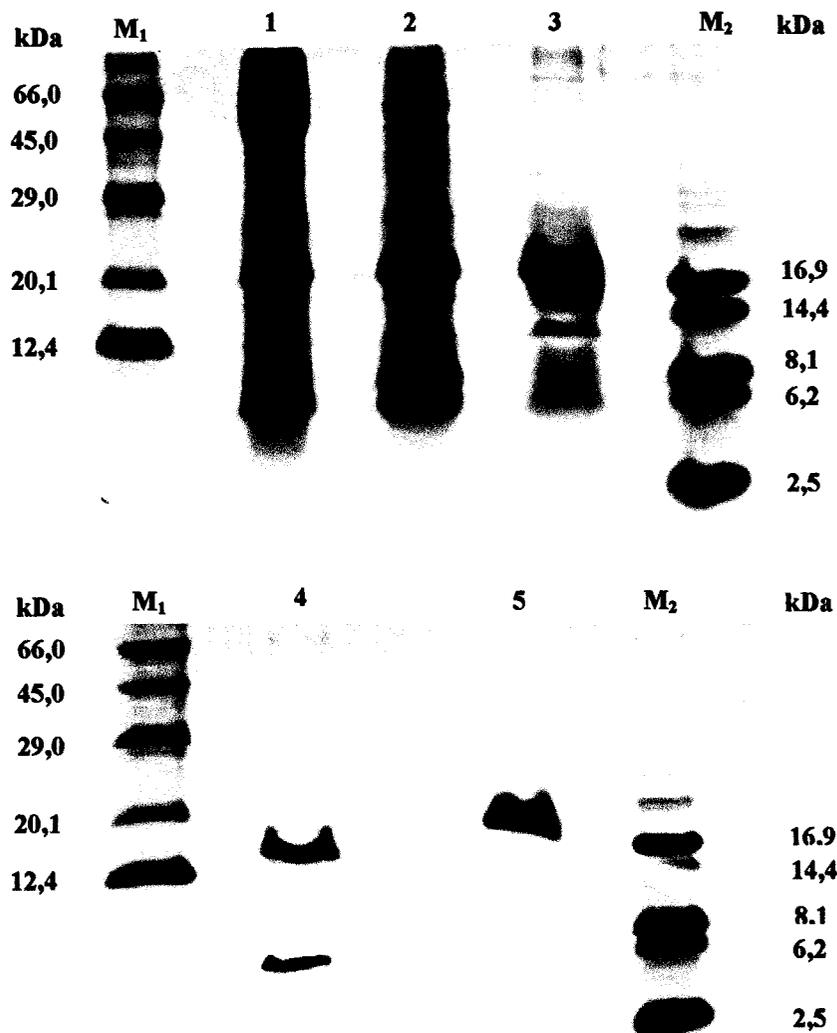


Fig. 9. Determinação do peso molecular por gel de SDS-PAGE corado com Coomassie Blue R 250. (M<sub>1</sub>) marcador de alto peso molecular. (M<sub>2</sub>) marcador de baixo peso molecular. (1) Estrato bruto de *Cassia leptophylla*. (2) Fração 12 coletada da coluna Superdex75. (3) Fração 18 eluída por cromatografia de troca iônica. (4) Fração 25 coletada da recromatografia em Mono-Q em condições redutoras e (5) Fração 25 eluída por recromatografia de troca iônica em condições não redutoras.

#### IV. 3.2 – Focalização isoeétrica

A focalização isoeétrica do CLTI mostrou a presença de uma única banda, o que indica a ausência de isoformas, com pI (ponto isoeétrico) de aproximadamente 4,4 (figura 10). A natureza ácida do pI determinado pela análise do gel para esta proteína é uma característica comum para os inibidores da família Kunitz [Richardon, 1991, Kalune *et al.*, 1995; Giri *et al.*, 2003; Teles *et al.*, 2004].

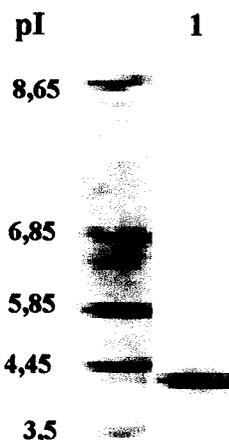


Fig. 10. Gel de pI usando gradiente de pH de 3,5 a 8,65.  
(1) Mostra o pI do inibidor purificado.

#### IV.3.3 – Separação das cadeias após redução e alquilação

A análise de eletroforese da fração 25 da recromatografia de troca iônica na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol revelou que a amostra é uma proteína composta por duas cadeias polipeptídicas.

Amostras desta fração foram coletadas reunidas e foram reduzidas e alquiladas. Após este processo, as cadeias foram separadas na coluna de fase reversa (figura 11). A cadeia de menor massa molecular e a cadeia de maior massa molecular foram eluídas no tempo de retenção de 50 e 60 minutos, respectivamente.

A cadeia eluída no tempo de retenção de 60 minutos corresponde à cadeia  $\alpha$  (maior) com massa molecular estimada por gel de eletroforese de 16kDa. Enquanto que a cadeia eluída no tempo de retenção de 50 minutos corresponde à cadeia  $\beta$  (menor), com uma massa molecular estimada por gel de eletroforese em torno de 5kDa. As frações de cada cadeia foram coletadas reunidas e submetidas à análise da região do N-terminal.

Estes resultados estão de acordo com os dados encontrados na literatura para os inibidores de protease do tipo Kunitz. Estes inibidores são formados por duas cadeias polipeptídicas, uma cadeia  $\alpha$  com 16kDa e uma cadeia  $\beta$  com 5kDa, unidas por ligação dissulfeto [Negreiro *et al.*, 1991; Oliva *et al.*, 2000].

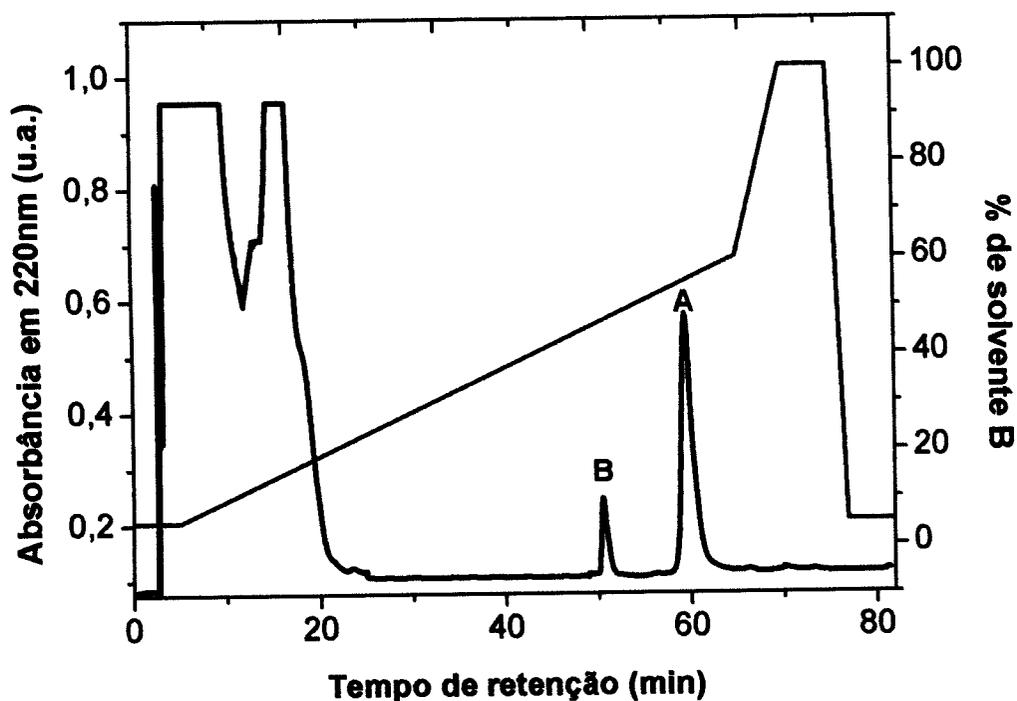


Fig. 11. Perfil cromatográfico da coluna de fase reversa (C-18) do inibidor, após a redução e alquilação. A amostra foi eluída utilizando gradiente descontínuo dos solventes A (0,1% de TFA em água) e solvente B (10% de água contendo 90% de acetonitrila e 0,1% de TFA) em um fluxo de 1mL/min. Os dois picos representam a cadeias A e B que constituem o inibidor.

#### IV. 3.4 – Seqüência N-terminal

Para determinar a seqüência da região N-terminal do CLTI, amostras do inibidor nativo foram reduzidas e carboximetiladas. As cadeias- $\alpha$  e  $\beta$  da proteína foram separadas por meio da cromatografia de fase reversa em coluna C 18. Com amostras da cadeia- $\alpha$  não foi possível determinar a seqüência N-terminal, sugerindo que a seqüência está bloqueada. Por outro lado, com amostras da cadeia- $\beta$  foi possível determinar a seqüência N-terminal de 24 aminoácidos: Ala<sup>1</sup>-Thr-Glu-Asp-Glu-Lys-Lys-Asp-Leu-Gly<sup>10</sup>-Ile-Ser-Ile-Asp-Asp-Cys-Cys-Asn-Arg-Arg<sup>20</sup>-Leu-Val-Val-Lys.

A busca em banco de dados por meio do sistema NCBI-BLAST usando a seqüência N-terminal da cadeia- $\beta$  obtida revelou significativa homologia com outros inibidores de tripsina tipo Kunitz isolados de outras Leguminosae. As proteínas que apresentaram homologia foram: cadeia- $\beta$  do inibidor de protease de sementes de *Adenantha pavonina* (DE5- $\beta$ ) [Richardson *et al.*, 1986], inibidor de tripsina de *Prosopsis juliflora* (PJTI- $\beta$ ) [Negreiros *et al.*, 1991] e o inibidor de *Acacia confusa* (ACTI- $\beta$ ) [Wu e Lin, 1993]. Estas proteínas apresentaram identidades em relação ao CLTI de 80%, 76% e 75%, respectivamente.

O alinhamento do N-terminal da cadeia- $\beta$  do CLTI com as proteínas homólogas é apresentado na figura 12.

	Seqüência				
Inibidor	1	10	20	30	41
	-----+-----+-----+-----+				
DE5-B	LECKDLGISIDDDNRRRLAYKEGDPLYVYQFYNADREGN				
PJTI-B	SDRCKDLGISIDEENRRRLVYKGDPLAYRFYKANRRG				
ACTI-B	DDESKDLGISIDDENRRRLVYKGDHPLAYRFEKAHRSG				
CLTI-B	ATEDEKDLGISIDDCNRRRLVYK				
Consenso	...decKDLGISID# <sub>n</sub> NRRLvYK.g.pl.v.f..a.r.g.				

Fig. 12. Seqüência parcial da cadeia- $\beta$  do inibidor de *Cassia leptophylla* (CLTI- $\beta$ ) alinhada com a seqüência completa da cadeia- $\beta$  dos inibidores de tripsina isolados de *Adenantha pavonina* (DE5- $\beta$ ), de *Prosopsis juliflora* (PJTI- $\beta$ ) e de *Acacia confusa* (ACTI- $\beta$ ). Os aminoácidos em vermelho ocorrem em todas as cadeias, enquanto que os aminoácidos em azul não ocorrem em todos os inibidores alinhados.

#### IV. 3.5 – Formação do complexo inibidor-tripsina

O sítio reativo de um inibidor de protease é definido como a região da molécula que entra em contato direto com o centro ativo da enzima formando um complexo enzima-inibidor [Richardson, 1991]. Os estudos estequiométricos mostraram que o CLTI incubado com tripsina forma um complexo estável tripsina-inibidor na razão molar 1: 1.

A figura 13 mostra o perfil cromatográfico do complexo e da tripsina em forma livre eluídos da coluna Superdex 200. Observa-se um pico de aproximadamente 44kDa correspondente à soma das massas das duas proteínas que formam o complexo e um pico de 24kDa que equivale à massa da tripsina na forma livre. Estes resultados indicam a presença de um único sítio reativo para a enzima.

Os resultados encontrados neste trabalho em relação à razão estequiométrica estão de acordo com outros inibidores tipo Kunitz [Sampaio *et al.*, 1996; Batista *et al.*, 1996; Oliva *et al.*, 1999; Macedo *et al.*, 2000; Mello *et al.*, 2002].

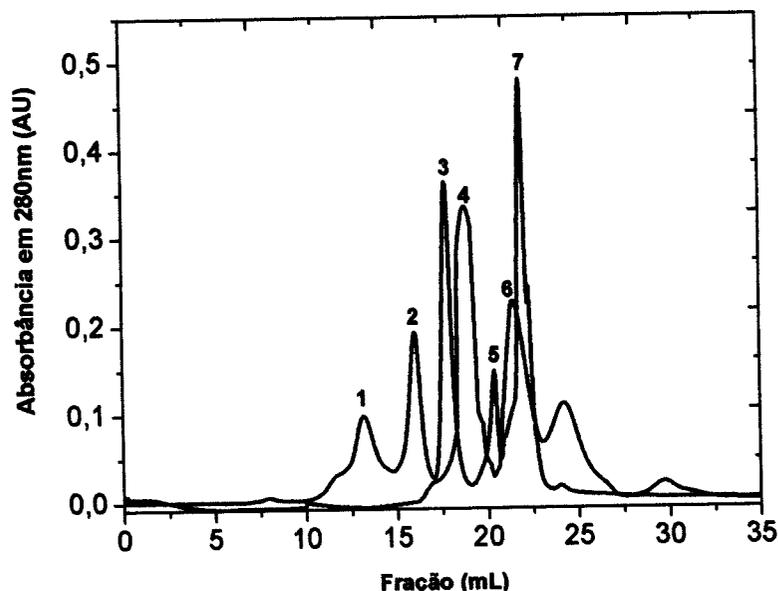


Fig. 13. Gel filtração do complexo enzima-inibidor em Superdex 200. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl pH 8,0 contendo 0,1M de NaCl. Os picos 1, 2, 3, 5 e 7 equivalem aos padrões de massa molecular miosina,  $\beta$ -galactosidase, BSA, anidrase carbônica e citocromo C, respectivamente. O pico 4 corresponde ao complexo enzima-inibidor e o 6 à forma livre da tripsina

## IV. 4 – ATIVIDADE BIOLÓGICA

### IV. 4.1 – Atividade anticoagulante

A propriedade do CLTI em afetar a coagulação sanguínea foi testada pré-incubando esta proteína com plasma humano. Os testes mostraram que o inibidor prolonga o tempo de coagulação em cerca de 20 vezes em relação ao controle, indicando que o inibidor interage com enzimas da cascata de coagulação sanguínea.

Inúmeros trabalhos têm mostrado que inibidores de serinoprotease bloqueiam enzimas envolvidas na coagulação sanguínea, na fibrinólise, além de possuir efeitos antiinflamatórios. A ação destes inibidores ocorre por meio da formação de complexos com enzimas específicas. [Batista *et al.*, 1996; Oliva *et al.*, 2000].

Múltiplos mecanismos estão envolvidos nas variações patológicas que causam a inflamação. Inibidores de protease são instrumentos bioquímicos úteis para elucidar as funções específicas das células e dos seus produtos nos referidos mecanismos e entender o papel de enzimas proteolíticas na coagulação sanguínea.

### IV. 4.2 – Testes de atividade inibitória

Estudos com sementes de leguminosas têm mostrado que esta família é rica em inibidores de serinoprotease [Richarson, 1991; Xaver-Filho, 1992; Souza *et al.*, 1995; Batista *et al.*, 1996; Macedo *et al.*, 2000; Oliva *et al.*, 2001]. A especificidade inibidora da proteína isolada de sementes de *Cassia leptophylla* foi testada com diferentes proteases tais como: tripsina, quimotripsina, elastase e calicreína.

Os ensaios de atividade residual enzimática mostraram que o inibidor de protease isolado neste trabalho apresentou alta afinidade pela tripsina, com um valor de  $K_i = 1,92\text{nM}$  e pela quimotripsina com  $K_i = 14,5\text{nM}$ . Entretanto, o inibidor mostra-se quase oito vezes mais específico para tripsina do que para a outra enzima testada. A figura 14 representa as curvas de inibição destas enzimas obtidas a partir de concentrações crescentes do inibidor, em condições de estabelecimento do equilíbrio da reação de inibição.

As propriedades inibitórias do CLTI estão de acordo com os resultados encontrados para o inibidor isolado de *Cajanus cajan* [Haq e Khan, 2003]. O trabalho de Mello [Mello *et al.*, 2002] determinou uma alta afinidade do segundo inibidor purificado de sementes de *Dimorphandra mollis* pela tripsina com um  $K_i=1,7\text{nM}$ . Estes resultados são semelhantes aos encontrados nos testes realizados com o inibidor isolado de *Cassia leptophylla*. Portanto, o valor determinado para o  $K_i$  deste inibidor está de acordo com dados descritos para outros inibidores de tripsina isolados de plantas.

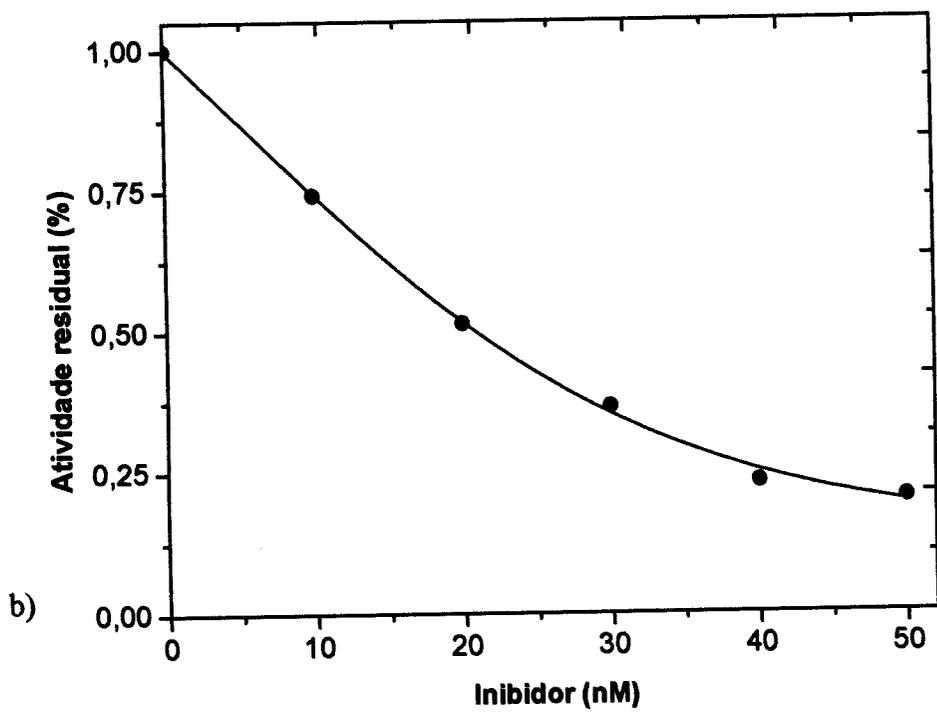
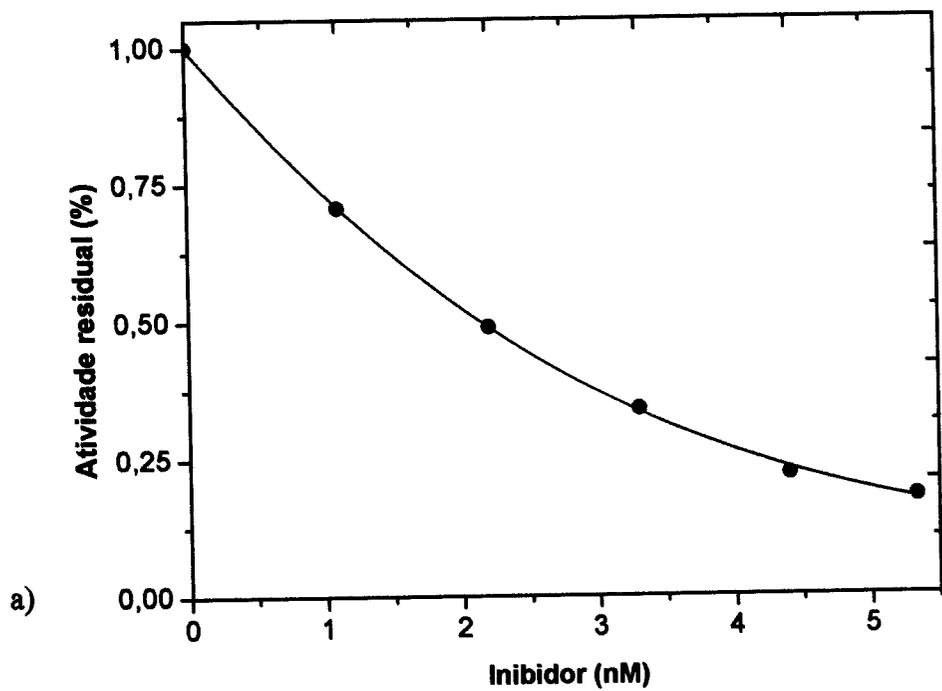


Fig. 14. (a) Curva da atividade enzimática residual da tripsina na presença de concentração crescente do inibidor isolado de *C. leptophylla*. (b) O gráfico representa a atividade inibidora de CLTI sobre quimotripsina em concentrações crescentes do inibidor.

Os estudos de atividade inibitória sobre outras enzimas encontraram uma fraca inibição sobre caliceína plasmática humana (HuPK) com um  $K_i = 1,5 \mu\text{M}$  (figura 15) e nenhuma inibição sobre elastase pancreática de porco (PPE) foi detectada nestes experimentos. Estudo com o segundo inibidor isolado de *Dimorphandra mollis* [Mello *et al.*, 2002] apresentou as mesmas propriedades inibitórias para a HuPK e para a PPE determinada neste trabalho.

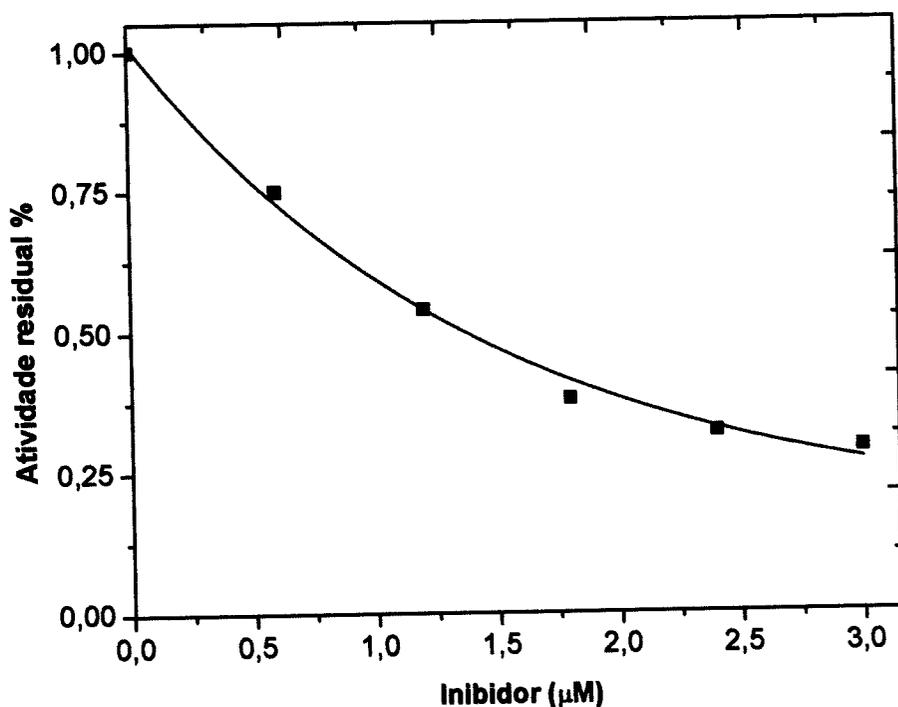


Fig. 15. Curva de inibição de caliceína por concentrações crescentes do inibidor purificado de *C. leptophylla*.

A tabela 2 mostra as constantes de inibição do inibidor de tripsina isolado de *Cassia leptophylla* (CITI) e a constante de outros inibidores isolados de outras espécies de leguminosas. Fazendo uma análise comparativa entre as constantes de inibição do CITI com as de outros inibidores apresentados na tabela, pode-se afirmar que o inibidor isolado de *Cassia leptophylla* é um potente inibidor de tripsina.

Inibidor	K <sub>i</sub> para Tripsina	K <sub>i</sub> para Quimotripsina	K <sub>i</sub> para calicreína plasmática
CITI	1,92nM	15,5nM	1,5μM
DmTI-II	1,7nM	Não inibiu	0,31μM
SwTI	47,4nM	0,12μM	20,25nM
LITI	25nM	14nM	6,3nM
DrTI	21,9nM	Não inibiu	5,25nM

Tabela 2. Mostra as constantes de inibição do CITI e de outros inibidores. (DmTI-II) é o segundo inibidor de tripsina isolado de sementes de *Dimorphandra mollis* [Mello *et al.*, 2002]. (SwTI) inibidor de tripsina isolado de *Swartzia pickelli* [Batista, 1996]. (LITI) inibidor de tripsina isolado de *Leucaena leucocephala* [Oliva *et al.*, 2000] e o inibidor de tripsina isolado de *Delonix regia* (DrTI) [Pando *et al.*, 2001].

As propriedades inibitórias do CLTI estão relacionadas com a função dos inibidores de proteases presentes em plantas. Estes inibidores são proteínas de estoque vegetal, regulam a atividade proteolítica [Ryan, 1990; Kato *et al.*, 2002] e fazem parte do sistema de defesa da planta contra patógenos, por meio da inibição de suas enzimas proteolíticas [Sampaio *et al.*, 1996; Shewry e Lucas., 1997; Franco *et al.*, 2003].

#### IV. 4.3 – Atividade inibitória do crescimento de fungos fitopatógenos

A propriedade do CLTI em inibir o crescimento de fungos foi testada com as seguintes cepas: *Colletotrichum sp.* F37, *Colletotrichum sp.* P10, *Fusarium moniforme* e *Fusarium graminearum*.

O inibidor apresentou atividade fungicida sobre as cepas de *Fusarium*, a dose mínima inibitória foi de 50μg/poço (2,5nM) para *Fusarium moniforme* (figura 16a), enquanto que para *Fusarium graminearum* foi de 25μg/poço (1,25nM) (figura 16b).

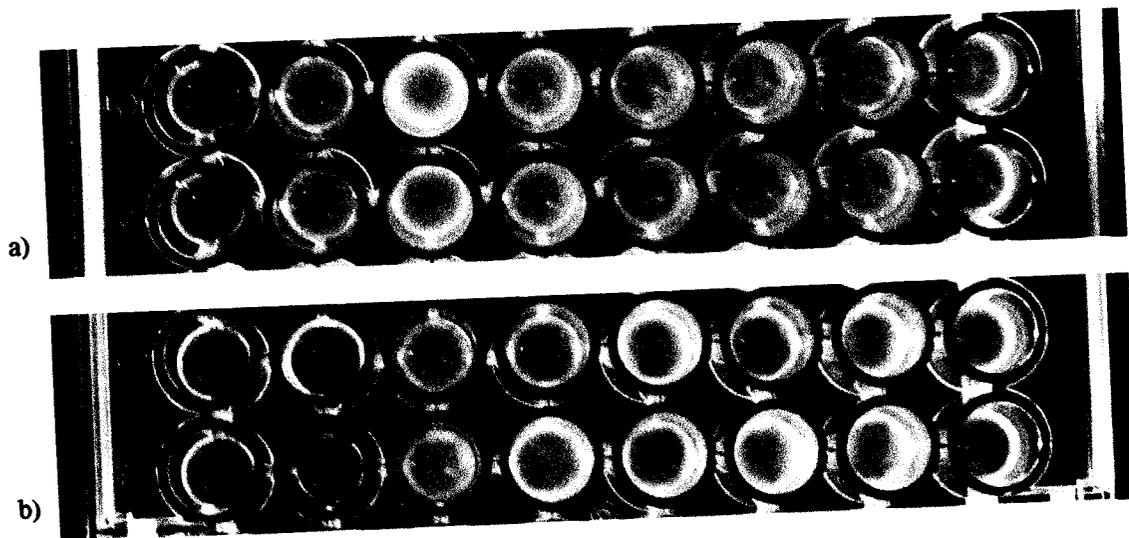


Fig. 16. Mostra a atividade antifúngica do inibidor em duplicata usando microplacas de titulação. (a) Inibição do crescimento do fungo *Fusarium moniforme* e em (b) inibição do crescimento do fungo *Fusarium graminearum*. Em ambos os testes, utilizou-se diluição seriada do inibidor com uma concentração inicial de  $50\mu\text{g/poço}$  (na direção da esquerda para a direita). O último poço de cada placa é o controle (fungo em PD).

Para ambas as cepas de *Colletotrichum* testadas, o inibidor apresentou propriedades fungistáticas, sendo necessária uma concentração de no mínimo  $50\mu\text{g/poço}$  ( $2,5\text{nM}$ ) de proteína (figura 17).

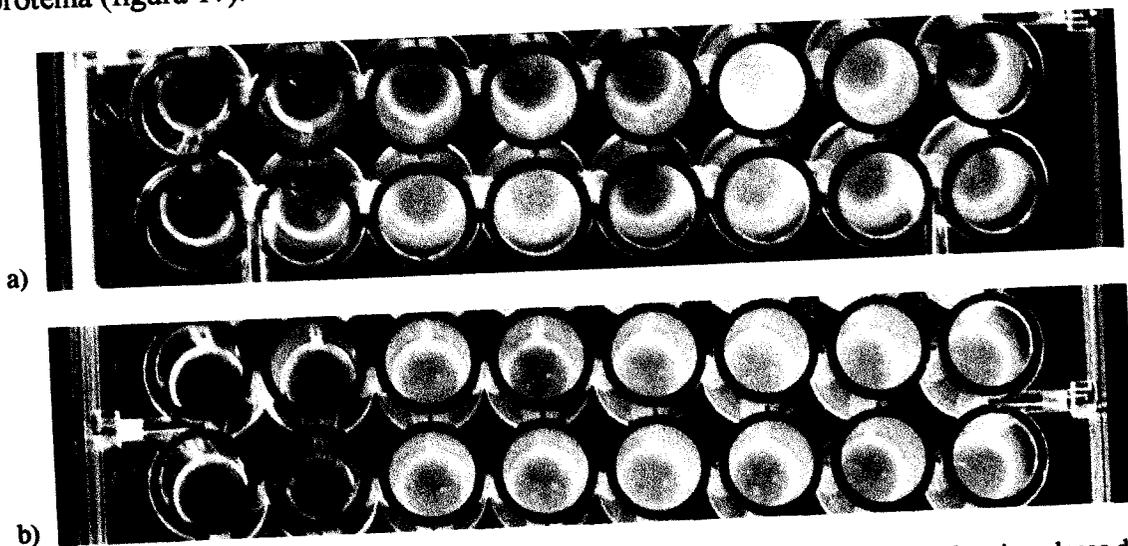


Fig. 17. Teste de inibição do crescimento dos fungos realizados em duplicatas usando microplacas de titulação e diluição seriada da proteína. (a) Propriedade fungistática do inibidor sobre *Colletotrichum sp. F37*. (b) Atividade fungistática da proteína sobre *Colletotrichum sp. P10*. Em ambos os testes, utilizou-se diluição seriada do inibidor com uma concentração inicial de  $50\mu\text{g/poço}$  (na direção da esquerda para a direita). O último poço de cada placa é o controle (fungo em PD).

Portanto, o inibidor possui propriedades antifúngicas para *Fusarium*, sendo mais eficaz para *Fusarium graminearum*. Por outro lado, a proteína não inibiu o crescimento das cepas de *Colletotrichum*, contribuindo somente para retardá-lo, pois apresenta apenas propriedades fungistáticas para estas cepas.

Inibidores de protease de planta com a habilidade de inibir o crescimento de fungos *in vitro* têm sido relatados por muitos trabalhos [Terras *et al.*, 1992; Vernekar *et al.*, 1999]. Lorito (1994) foi o primeiro a relatar que inibidores de tripsina e quimotripsina de folhas de couve exibem atividade antifúngica sobre *Botrytis cinerea* e *Fusarium solani* [Lorito *et al.*, 1994].

A resistência de plantas a ataques de insetos herbívoros e patógenos pode ser aumentada pela inserção de genes que expressam inibidores de proteases em plantas transgênicas. Este enfoque tem sido investigado por Hilder [Hilder *et al.*, 1987], e Hoffman [Hoffman *et al.*, 1992] ao demonstrar que a transferência de genes – que codificam inibidores de tripsina – de algumas plantas para outras culturas, tais como o tabaco, aumenta sua resistência a ataques de insetos herbívoros e fungos.

Inibidores de protease são moléculas que podem ser utilizadas como possíveis ferramentas para melhorar a resistência da planta contra ataques de insetos e microorganismos por meio da engenharia genética [Ryan, 1990; Christeller *et al.*, 1992; Giri, 1998]. As principais vantagens de utilizar este tipo de proteína para aumentar a resistência das plantas são: fazem parte do sistema de defesa da planta, não impõem efeitos tóxicos de longo prazo sobre outros insetos e plantas e não reduzem drasticamente a mortalidade dos mesmos, diminuindo a probabilidade das populações de insetos descendentes desenvolverem resistência [Harsulkar *et al.*, 1999].

## IV. 5 – ASPECTOS ESTRUTURAIS APRESENTADOS PELO CLTI

O espectro de dicroísmo circular no UV distante do inibidor em tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0 mais de NaCl 150mM em temperatura ambiente é mostrado na figura 18. Este espectro é caracterizado por duas bandas, uma fraca com um máximo em aproximadamente 230nm e uma outra banda bem intensa com um mínimo em 200nm. A acentuada banda negativa em torno de 200nm é típica de estruturas desordenadas. Por outro lado, o sinal em 230nm pode ser atribuído às cadeias laterais dos aminoácidos aromáticos, tirosina e triptofano.

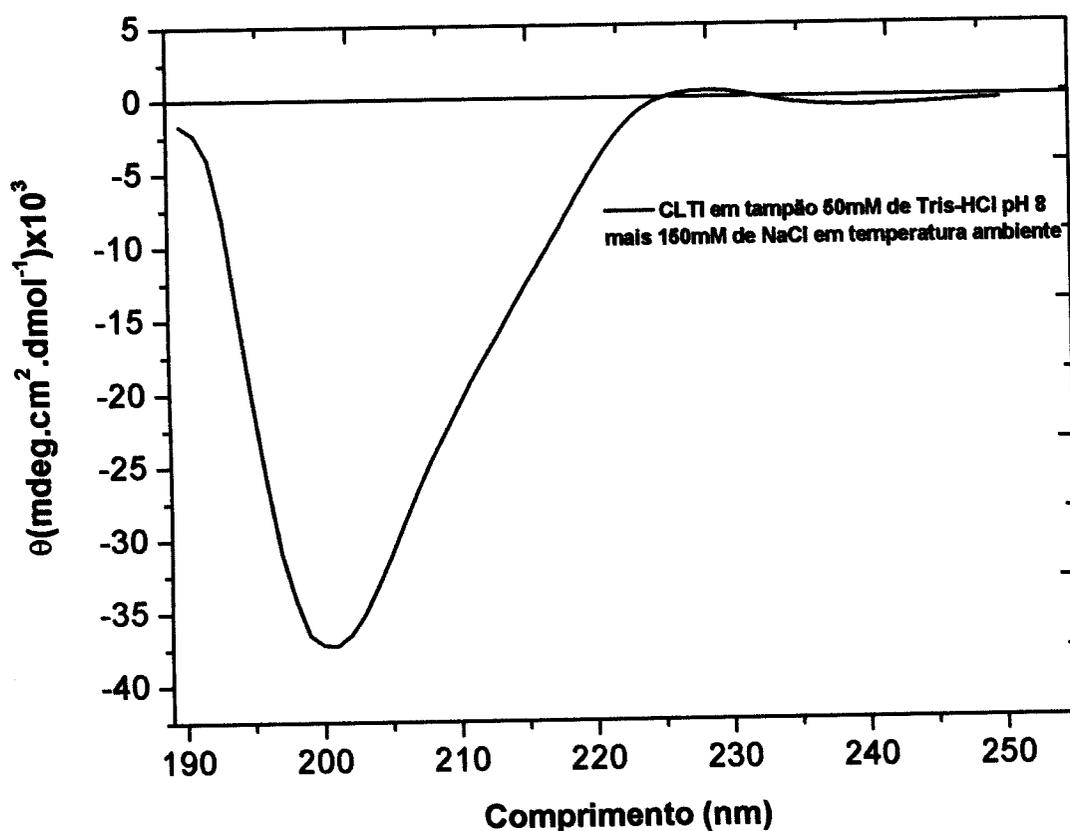


Fig. 18. Espectro de CD do inibidor. As medidas foram registradas com aproximadamente 0,2mg/mL da amostra e os espectros foram registrados variando o comprimento de onda de 190 a 250nm com uma média de 16 varreduras.

A análise dos espectros de CD de várias proteínas que apresentam bandas positivas na região de 225 a 230nm [Woody, 1994] tem mostrado que suas cadeias laterais de tirosina e/ou

triptofano contribuem para a banda nesta faixa de comprimento de onda. Geralmente esta banda é fraca, mas as conformações desordenadas das proteínas podem aumentar seu sinal.

Os trabalhos de Woody e Dunker (1996) têm mostrado que a maioria dos inibidores polipeptídicos de protease encontrados em sementes apresentam uma grande fração de estruturas desordenadas. O grupo destas proteínas usualmente mostra espectros de CD com uma forte banda negativa ao redor de 200nm e uma fraca banda entre 220 e 230nm, que pode ter um sinal positivo ou negativo [Conelli *et al.*, 1985; Ramasarma *et al.*, 1994; Haq e Khan, 2003].

A desconvolução do espectro do CLTI – efetuada pelo programa Selcon 3, com uma base de dados de 37 proteínas – mostrou que ocorrem no inibidor 7% de  $\alpha$ -hélices; 23% de voltas- $\beta$ ; 34% de folhas- $\beta$  e 36% de estruturas desordenadas (RMS 0,62).

Estes dados obtidos são semelhantes aos encontrados para outros inibidores tipo Kunitz tais como: inibidores de proteases isolados de *Schizolobium parahyba* e de *Cajanus cajan* que são formados principalmente de folhas- $\beta$  e estruturas desordenadas [Teles *et al.*, 2004; Haq e Khan, 2003]. Os resultados já citados também estão de acordo com os obtidos pela desconvolução das estruturas secundárias determinadas para o inibidor de calicreína plasmática tipo Kunitz de sementes de *Bauhinia bauhinoides* (BbKI) estudado em nosso laboratório [Vieira, 2004].

#### **IV. 5.1 – Estabilidade conformacional do inibidor investigada por CD em função do pH**

As variações dos espectros de CD em função do pH mostram que os espectros das amostras em pHs ácidos (abaixo de 6,1) estão ligeiramente deslocados para o vermelho, com uma discreta perda da intensidade dos mesmos-(figura 19).

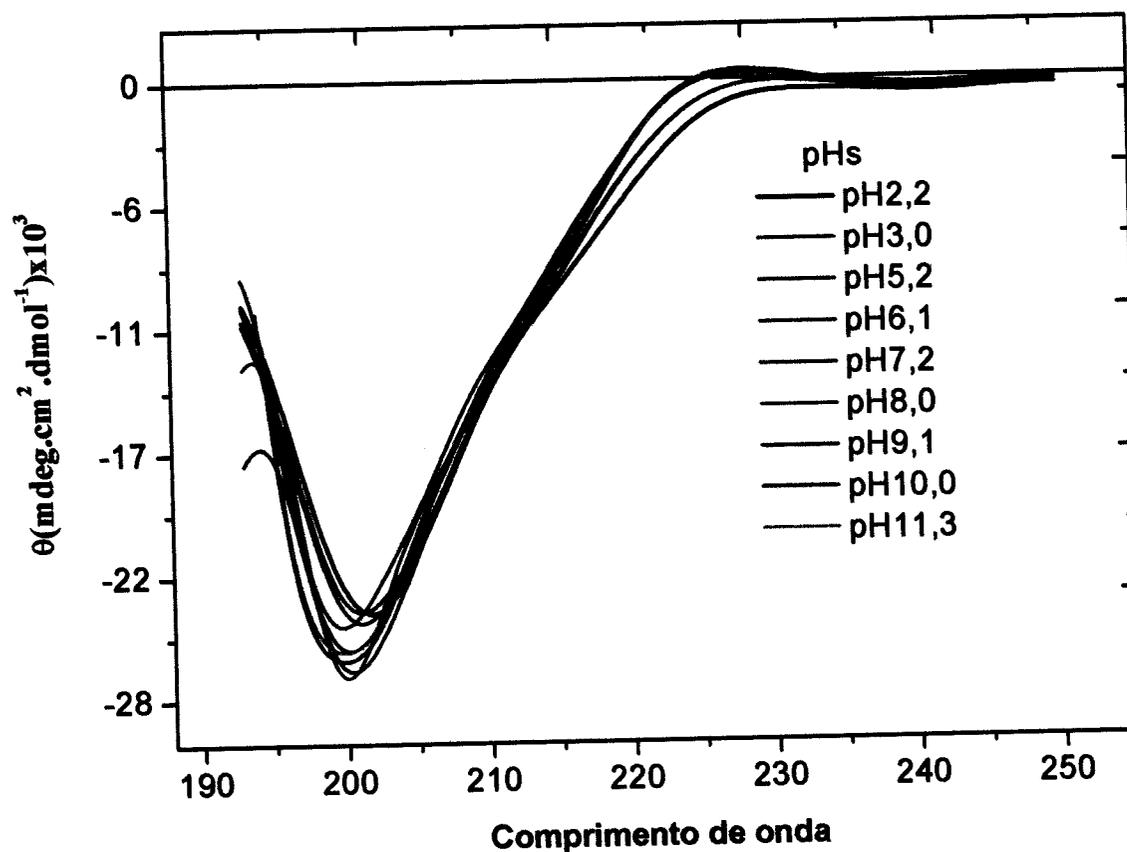


Fig. 19. Espectros de CD no UV distante do inibidor em diferentes pHs (2,0 a 11,0) em temperatura ambiente. As medidas foram realizadas com as amostras concentradas ao redor de 0,2mg/mL variando o comprimento de onda de 193 a 250nm.

Estes dados mostram que a conformação da proteína é ligeiramente afetada em pHs ácidos. Estudos de CD em função do pH (2,0; 7,0 e 10,0) de um inibidor de tripsina de sementes de *Cajanus cajan* [Haq e Khan, 2003] mostraram que este inibidor sofre pequenas alterações em seus espectros em pHs extremos (ácidos e alcalinos) em relação ao pH 7,0; mas a conformação da proteína é estável. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os dados apresentados para o inibidor isolado de *Cajanus cajan*.

#### **IV. 5.2 – Estabilidade conformacional do inibidor investigada por CD em função da temperatura**

As alterações conformacionais do inibidor foram estudadas por CD no UV distante em função da temperatura. As medidas foram realizadas com as amostras concentradas ao redor de 0,2mg/mL em tampão de Tris-HCl 50mM contendo NaCl 150mM pH 8,0, variando a temperatura de 25°C a 90°C, em intervalos de 5°C. O inibidor foi incubado por 15 minutos em cada temperatura e os espectros foram registrados entre o comprimento de onda de 190 a 250nm, com uma média de 16 varreduras.

Os espectros do inibidor mostrados na figura 20 indicam que entre as temperaturas de 25°C a 40°C a proteína permanece na sua conformação nativa, com uma discreta diminuição da intensidade da banda de mínimo (~200nm); esta ligeira perda de intensidade continua até a temperatura de 55°C. Após 45°C, ocorre também uma ligeira perda da banda de máximo em torno de 230nm, que se acentua após 55°C. Portanto, entre 25°C e 55°C o inibidor é estável, pois se observa que nestas condições ocorrem poucas alterações no seu espectro de CD.

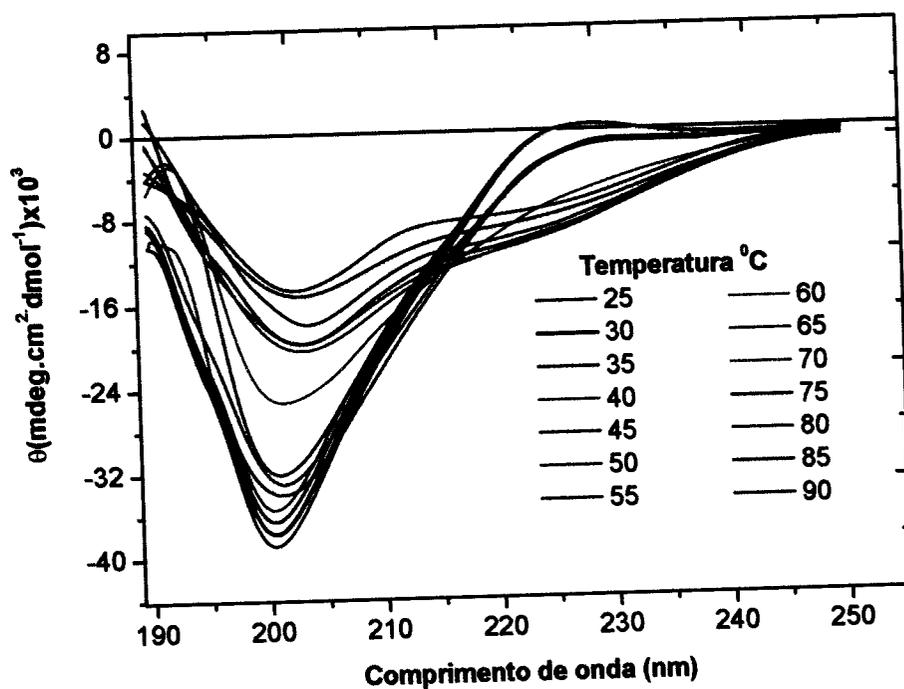


Fig. 20. Espectro de CD registrado de 190 a 250nm, acompanhando o efeito da temperatura sobre o inibidor. A temperatura investigada variou de 25°C a 90°C com intervalo de 5°C. A amostra foi incubada em um banho térmico acoplado no aparelho.

Por outro lado, as alterações significativas dos espectros indicando mudanças conformacionais iniciaram-se após 55°C. A partir desta temperatura, ocorrem significativas perdas da intensidade da banda de mínimo sendo mais evidente a partir de 65°C.

O gráfico mostrado na figura 21 representa os dados obtidos do experimento equivalente à figura 20 com o monitoramento do comprimento de onda em 200nm. Este gráfico é uma curva de transição das alterações das estruturas secundárias do inibidor em função da temperatura.

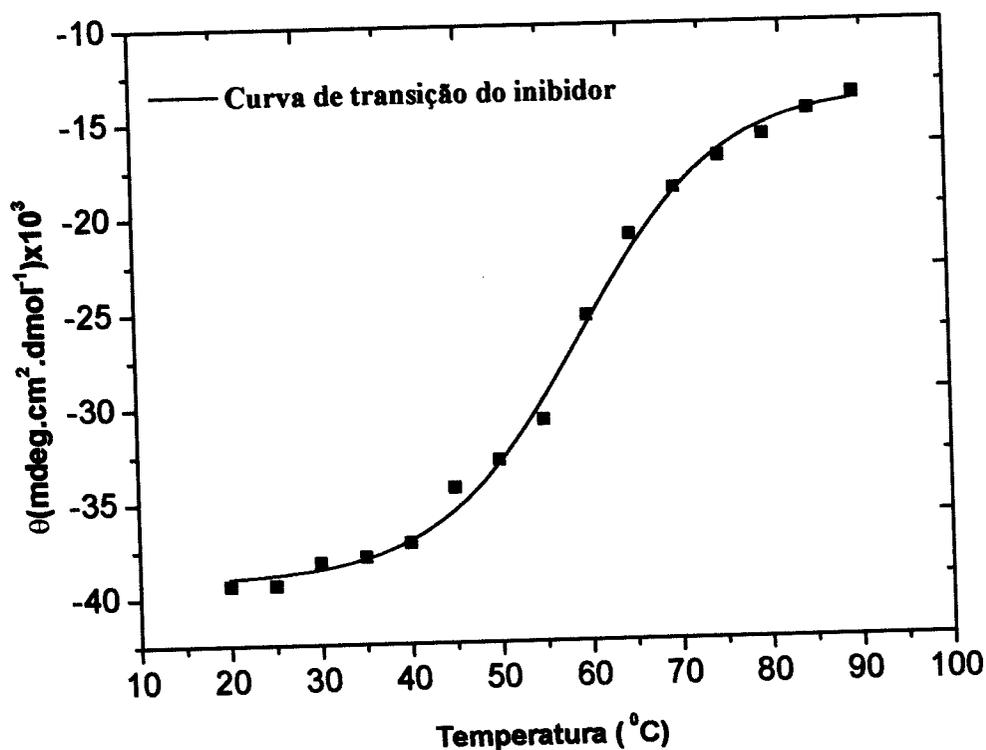


Fig. 21. Curva de transição em função da temperatura do inibidor monitorada no comprimento de onda de 200nm.

Esta curva indica que em aproximadamente 59°C é o ponto em que ocorre a transição. Portanto, abaixo desta temperatura a proteína apresenta-se enovelada com discretas alterações em sua estrutura e acima deste ponto a proteína inicia o processo de desnaturação.

Trabalhos de Bronze (1990) têm mostrado que as pontes dissulfeto intramoleculares são prováveis responsáveis pela estabilidade térmica dos inibidores da família Kunitz. Entretanto, estudos recentes descrevem inibidores isolados de sementes de *Bauhinia sp.* que não apresentam pontes dissulfeto e nem resíduos de cisteínas [Oliva *et al.*, 2001], mas demonstram estabilidade térmica semelhante à encontrada no inibidor estudado neste trabalho.

#### IV. 6 – FLUORESCÊNCIA

Medidas de fluorescência foram feitas utilizando amostras do inibidor em PBS pH 7,6 com excitação em 280 e 295, sendo seus espectros monitorados em 295 – 450nm e 305 – 450nm, respectivamente.

Os espectros obtidos com a excitação em 280 e 295nm não apresentaram diferenças no posicionamento do comprimento de onda de emissão máxima da fluorescência de suas bandas (figura 22). Estes espectros caracterizam-se por uma banda com comprimento de onda de emissão máxima em 325,7nm, indicando que o triptofano está exposto em um ambiente hidrofóbico, fora do contato com o solvente [Lakowicz, 1983]. A maior intensidade de emissão quando excitada em 280 nm é devido à transferência de eletros dos resíduos da tirosina para triptofano, fenômeno este descrito na literatura quando ambos os cromóforos estão presentes na proteína [Lakowicz, 1983], explicando o fato de ser suprimida a banda de emissão da tirosina.

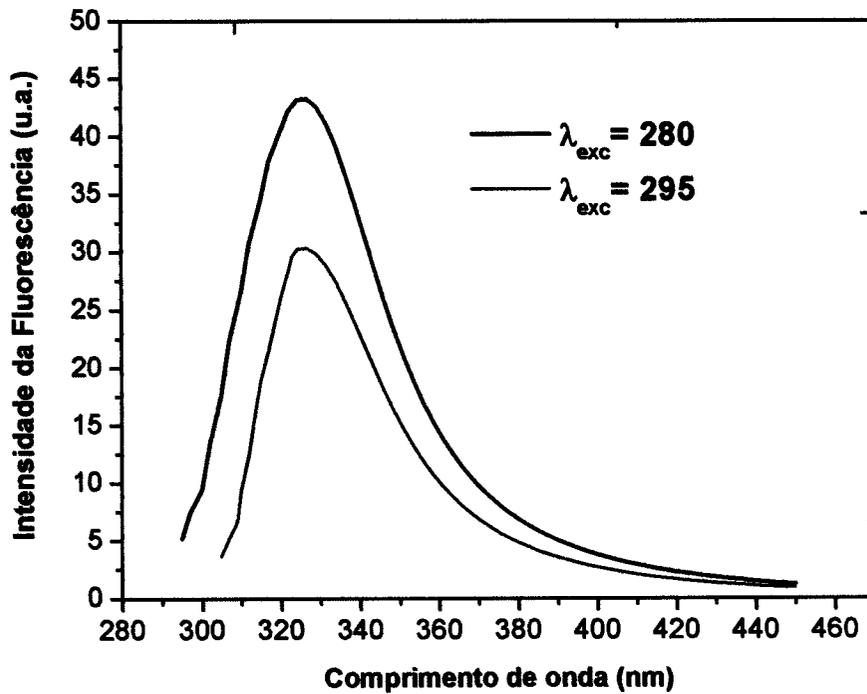


Fig. 22. Os espectros de emissão do inibidor em PBS pH 7,6. (—) Medida de fluorescência com excitação em 280 e o espectro registrado de 295 a 450. (—) Espectro com excitação em 295 e a emissão monitorada de 305 a 450nm.

Os espectros de emissão do inibidor em diferentes ambientes (variação de pH de 2,1 a 11,2) são apresentados na figura 23. O inibidor não mostrou deslocamento do máximo de emissão nesta ampla faixa de pH, indicando que a polaridade do micro ambiente do triptofano não é alterada. Entretanto, em valores extremos de pH ácido e básico ocorreram alterações na intensidade de emissão, o que pode significar discretas alterações (conformacionais ou iônicas) levando à supressão de emissão em pHs básicos e aumento da intensidade em pHs ácidos.

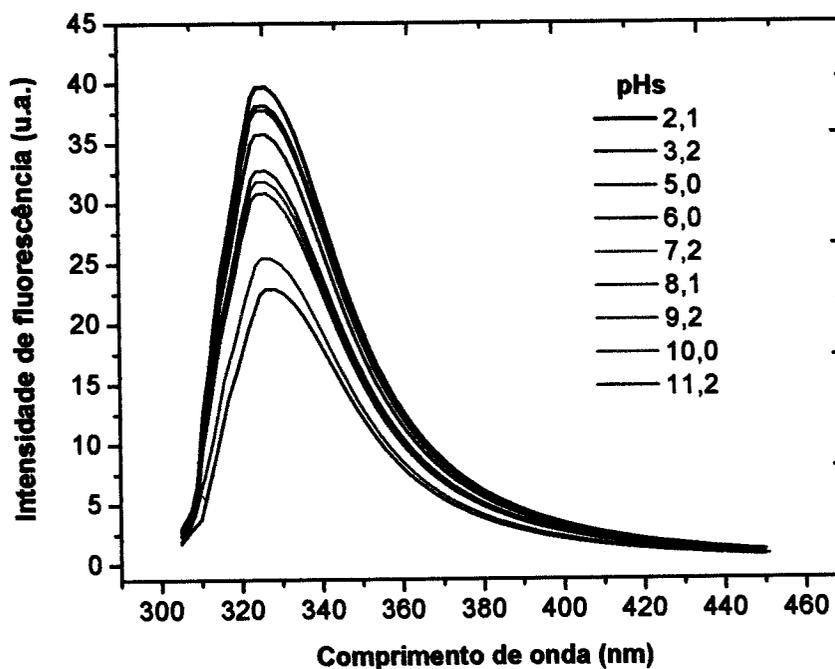


Fig. 23. Espectro de fluorescência da amostra do inibidor em diferentes ambientes, variando a pH da faixa de 2,0 a 11,0.

Estes dados mostram que o inibidor é estável na faixa de pH de 6 a 8 e apresenta discretas variações de sua estrutura em relação ao inibidor nativo em valores extremos de pH. Inibidores de proteases isolados de *Schizolobium parahyba* [Teles *et al.*, 2004] e *Bauhinia bauhinioides* [Vieira, 2004] apresentaram estabilidades conformacionais em extremos alcalinos e ácidos com ligeiras variações em suas estruturas. Estes resultados são semelhantes aos encontrados para o CLTI.

## V – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho o inibidor de protease da semente de *Cassia leptophylla* foi isolado e purificado (sendo denominado CLTI), com a finalidade de estudar suas propriedades físico-químicas, estruturais e atividades biotecnológicas. O interesse nos estudos de inibidores de proteases é baseado no seu potencial para o desenvolvimento de plantas mais resistentes a pragas [Ceciliani *et al.*, 1997; Heath *et al.*, 1997; Giri *et al.*, 2003] e agentes terapêuticos contra doenças tais como: inflamação, hemorragia [Oliva *et al.*, 2000] e câncer [DeClerck e Imrem, 1994; Kennedy, 1998]. Há também interesse nestes inibidores no combate a doenças tropicais tal como a malária [Billings *et al.*, 1987; Seelmeir *et al.*, 1988], pois estas proteínas têm mostrado propriedades inibidoras sobre protease que são crucias para o ciclo de vida de microorganismos causadores de tais doenças.

O CLTI foi submetido a três testes de atividade biológica: atividade anticoagulante, atividade inibitória sobre serinoproteases e atividade antifúngica. Os testes de atividade anticoagulante mostraram que o inibidor prolonga significativamente o tempo de coagulação sanguínea, portanto esta proteína interfere em algumas enzimas envolvidas na cascata de coagulação, provavelmente sobre aquelas da família das serinoproteases (calicreína, trombina, plasmina e os fatores XIII, XII entre outros). No entanto, os estudos *in vitro* mostraram que o CLTI possui propriedades inibidoras sobre tripsina e quimotripsina, sendo sua especificidade cerca de 8 vezes maior para tripsina, inibindo fracamente calicreína e não possui atividade sobre elastase. A literatura mostra que um grande número de inibidores tipo Kunitz são potentes inibidores de tripsina, mas inibem quimotripsina em graus variados [Bode *et al.*, 2000; Laskowski Jr & Quasim, 2000]. Os testes realizados para determinar a atividade antifúngica mostraram que o inibidor apresenta propriedades fungicidas para as cepas de *Fusarium* testadas e atividade fungistática para as cepas de *Colletotrichum*. Inibidores de

protease têm sido apontados como uma nova classe de proteínas que apresentam propriedades antifúngicas, podendo ser aplicados como ferramentas biotecnológicas, conforme argumentado anteriormente.

A seqüência N-terminal e os métodos espectroscópicos utilizados (CD e fluorescência) permitiram conhecer alguns aspectos estruturais sobre o CLTI, bem como demonstrar sua estabilidade frente a condições não favoráveis de pH e temperatura. A determinação do N-terminal da cadeia  $\beta$  e os resultados de CD, aliados aos resultados sobre inibição de serinoproteases, permitiram classificar o CLTI como inibidor do tipo Kunitz, semelhante aos oriundos de outras sementes de leguminosas descrito na literatura. Os resultados de CD e emissão de fluorescência, em função de pH e temperatura, mostraram a faixa de estabilidade do CLTI em função da temperatura, bem como a discreta alteração conformacional em condições extremas de pH (ácido e básico). Estes dados corroboram com as propriedades descritas para inibidores da família Kunitz, os quais mantêm 50% de sua atividade inibidora após serem submetidos a 60°C por 20 minutos e, quando submetidos a pHs extremos por até 30 minutos, ocorre pouca perda de sua atividade biológica [Macedo *et al.*, 2000; Mello *et al.*, 2002; Haq *et al.*, 2003; Teles *et al.*, 2004].

As perspectivas futuras a respeito deste trabalho podem ter como objetivo obter esta proteína de forma independente da maturação das sementes de *Cassia leptophylla*, realizando a clonagem e expressão heteróloga do inibidor, facilitando o estudo dos seguintes aspectos:

- conhecer sua seqüência primária completa;
- obter cristais, difratá-los e resolver sua estrutura tridimensional;
- investigar, se possível, para qual das enzimas da coagulação ocorre a seletiva atividade inibitória;
- estudar suas ações sobre outros microorganismos patógenos e fitopatógenos.

## VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADZU, B.; ABBAH, J.; VONGTAU, H.; GAMANIEL, K. Studies on the use of *Cassia singueana* in malaria ethnopharmacy. **Journal Ethnopharmacol**, v. 88, p. 261-266, 2003.
- APOSTOLUK, W.; OTLEWSKI, J. Variability of canonical loop conformations in serine proteinases inhibitors and other proteins. **Proteins: Struct. Functions and Gen.**, v. 32, p. 459-474, 1998.
- BATISTA, I. F. C.; OLIVA, M. L. V.; ARAÚJO, M. S.; SAMPAIO, M. U.; Richardson, M.; FRITZ, HANS.; SAMPAIO, C. A. M. Primary Structure of a kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisliquum* seeds. **Phytochemistry**, v. 41, n. 41, p.1017-1022, 1996.
- BIETH, J. G. Theoretical and practical aspects of proteinase inhibition kinetics. **Meth. Enzymol**, v. 248, p. 59-84, 1995
- BILLINGS, P. C.; CAREW, J.A.; KELLER-MCGANDY, C. E.; GOLDBERG, A. L.; KENNEDY AR. A serine protease activity in C3H/10T1/2 cells that is inhibited by anticarcinogenic protease inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.84, n. 14, p. 4801-4805, 1987.
- BIRK, Y. The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. **Int. J. Peptide Protein Res.**, v. 25, p. 113-131, 1985.
- BODE, W. & HUBER, R. Structural basis of the proteinase-protein inhibitor interaction. In: Avilés, F. X. **Innovations in proteases and their inhibitors**. New York, Walter De Gruyter, p.81-122, 1992.
- BODE, W.; HUBER, R. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, p. 241-252, 2000.
- BROADWAY, R. M.; VILLANI, M. G. Does host range influence susceptibility of herbivorous insects to novel plant proteinase inhibitors? **Entomol. exp. appl.**, v. 76, p. 303-312, 1995.
- BRONSE, G. J.; GIRARD, T. J.; NOVOTNY, W. F. Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor. **Biochemistry**, v. 29, p. 7539-7546, 1990.
- BUENO. N.R.; FRITZ, H.; AUERSWALD, E.A.; MENTELE, R.; SAMPAIO, M.; SAMPAIO, C.A. M. AND OLIVA, M.L.V. Primary Structure of *Dioclea glabra* Trypsin Inhibitor, DgTI, a Bowman-Birk Inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 261, p.838-843, 1999.
- CAVALCANTI, M. S. M. **Purificação e caracterização de uma lectina e de um inibidor de serinoproteinase de sementes de *Swartzia pickellii* Killip**. 1994. 116 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1994.

- CECILIAN, F.; IORI, A. T.; MORTARINO, M.; ODOARDI, M.; RONCHI, S. A trypsin inhibitor from *Snail medic* seeds active against pest proteases. **Phytochemistry**, v. 44, n. 3, p.393-398, 1997.
- CHRISTELLER, J. T.; LAING, W. A.; MARKWICK, N. P.; BURGESS, E. P. J. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions. **Insect Biochem. Mol. Biology**, v. 22, p. 735-746, 1992.
- CONNELLI, M.; CIONI, P.; ROMAGNOLI, A.; GABELLIERI, E.; BALESTRERI, E.; FELICIOLI, R. Purification and characterization of two leaf polypeptide inhibitors of leaf protease from alfalfa (*Medicago sativa*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 238, p. 206-212, 1985.
- COOPER, J.B. Aspartic proteinases in disease: a structural perspective. **Current Drug Targets**. v. 3, p. 155-173, 2002
- DECLERCK, Y. A.; IMREN, S. Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer. **European Journal Cancer**, v. 30A, p. 2170-2180, 1994.
- DECLERCK Y.A.. Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. **European Journal of Cancer**. v. 36, p. 1258-1268, 2000.
- DUNN, B. M. Determination of protease mechanism. In: Beynon, R. J. and BOND, J. S. eds. *Proteolytic enzymes*. Oxford, IRL Press, p. 57-81, 1989.
- FAVEL, A.; MATTRAS, H.; COLLETTI-PREVIERO, M. A.; ZWILLING, M. D. Protease inhibitors from *Eballium elaterium* seeds. **International Journal Pept. Protein Research**, v. 33, p.202-208, 1989.
- FASMAN, G. D. **Circular dichroism and conformational analysis of biomolecules**. Plenum Press, New York, 1996.
- FRANCO, O. L.; SANTOS, R.C.; BATISTA, J. O. N.; MENDES, A. C. M.; ARAÚJO, M. A. M.; MONERATT, R. G.; GROSSI DE SÁ, M. F.; FREITAS, S. M. Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 343-349, 2003.
- GARCIA-CARREÑO, F. I. Proteinase inhibitors. **Friends Food Sci. Technol**, v. 7, p. 197-204, 1996.
- GIRI, A. P.; KACHOLE, M. S. Amylase inhibitors of pigeonpea (*Cajanus cajan*) seeds. **Phytochemistry**, v. 47, p. 197-202, 1998.
- GIRI, A. P.; HARSULKAR, A. M.; KU, M. S. B.; GUPTA, V. V. D.; RANJEKAR, P. K.; FRANCESCHI, V. R. Identification of potent inhibitors of *Helicoverpa armigera* gut proteinases from winged bean seeds. **Phytochemistry**, v. 63, p. 523-532, 2003.
- GRZONKA, Z.; JANKOWSKA, E.; KASPRZYKOWSKI, F.; KASPRZYKOWSKA, R.; LANKIEWICZ, L.; WICZK, W.; WIECZERZAK, E.; CIARKOWSKI, J.; DRABIK, P.;

- JANOWSKI, R.; KOZAK, M.; JASKOLSKI, M.; GRUBB A. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. **Acta Biochim Pol.**, v. 48, n. 1, p. 1-20, 2001.
- GRAHM, J. S.; PEARCE, G.; MERRYWEATHER, J.; TITANI, K.; ERICSSON, L. H.; RYAN, C. A. Wound-induced proteinase inhibitors from tomato leaves. II. The cDNA-deduced primary structure of pre-inhibitor II. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, p. 6561-6564, 1985.
- HAQ, S. K.; KHAN, R. H. Characterization of a proteinase inhibitor from *Cajanus cajan* (L). **Journal of Protein Chemistry**, v. 22, n. 6, p. 543-554, 2003.
- HARSULKAR, A. M.; GIRI, A. O.; PATANKAR, A. G.; GUPTA, V. S.; SAINANI, M. N.; RANJEKAR, P. K.; DESHPANDE, V. V. Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of gut proteinases and larval growth of *Helicoverpa amigera*. **Plant Physiology**, v. 121 p. 495-506, 1999.
- HASS, G. M.; HERMODSON, M. A.; RYAN, C. A.; GENTRY, L. Primary structures of two low molecular weight proteinase inhibitors from potatoes. **Biochemistry**, v. 21, p. 752-756., 1982
- HEATH, R. L.; MCDONALD, G.; CRRISTELLER, J. T.; LEE, M.; BATEMAN, K.; WEST, J.; HEESWIJCK, R. V.; ANDRESON, M. A. Proteinase inhibitors from *Nicotiana glauca* enhance plant resistance to insect pests. **Jornal Insect Physiology**, v. 43, n. 9, p. 833-842, 1997.
- HILDER, V. A.; GATEHOUSE, A. M. R.; SHERMAN, S. E.; BARKER, R. F.; BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, v. 300, p. 161-163, 1987.
- HOFFMAN, M. P.; ZALOM, F. G.; WILSON, L. T.; SMILANICK, J. M.; MALYJ, L. D., KISER, J.; HILDER, V. A.; BARNES, W. M. Field evaluation of transgenic tobacco containing genes encoding *Bacillus thuringiensis* endotoxin ou Cowpea trypsin inhibitor: efficacy against *Helicovepa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). **J. Econ. Entomol**, v. 85, p. 2561-2522, 1992.
- HUANG, B.; FONG, C.C.; WAN, H. M.Y. Isolation of a trypsin inhibitor with deletion of N-terminal pentapeptide from the seeds of *Momordica cochinchinensis*, the Chinese drug mubiezh. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, p. 707-715, 1999.
- ISHIKAWA, C.; WATANABE, K.; SAKATA, N.; NAKAGAKI, C.; NAKAMURA, S.; TAKAHASHI, K. Azuki bean (*Vigna angularis*) protease inhibitors: isolation and amino acid sequences. **Journal Biochemistry**, v. 97, p. 55-70, 1985.
- KALUNE, D. E.; SOUZA, M. W.; MORPHY, L. Purification, characterization, sequence determination, and mass spectrometric analysis of a trypsin inhibitor from seeds of the Brazilian tree *Dipteryx alata* (Leguminosae). **Journal of Proteins Chemistry**, v. 14, p. 685-693, 1995.

- KATO, H. Regulation of function of vascular wall cells by tissue factor pathway inhibitor-basic and clinical aspects. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 22, p. 539-548, 2002.
- KENENDY, A. R. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. **Am. J. Clin. Nutrition**, v. 68, p. 1406S-1412S, 1998.
- KIM, Y. M.; LEE, C.H.; KIM, H.G.; LEE, H. S. Anthraquinones isolated from *Cassia tora* (Leguminosae) seed show an antifungal property against phytopathogenic fungi. **J Agric Food Chem.**, v. 52, p. 6096-6100, 2004.
- KNIGHT, C.G. The characterization of enzyme inhibition, In. Barret & Salvensen, *Proteinase Inhibitors*. Cambridge, Elsevier, p. 23-51, 1986.
- KOIDE, T.; IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitors. 3. Amino-acid sequences of the carboxyl-terminal region and the complete amino-acid sequence of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). **Eur J Biochem.**, v. 1, n. 32, p. 417-431, 1973.
- KOIWA, H.; BRESSAN R.A. AND HASEGAWA, P.M. Regulation of protease inhibitors and plant defense. **Trends in plant science**. V. 2, n. 10, p. 379-384, 1997.
- KOIWA, H.; SHADE, R. E.; ZHU-SALZMAN, K.; SUBRAMANIAN, L.; MURDOCK, L. L.; NIELSEN, S. S.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Phage display selection can differentiate insecticidal activity of soybean cystatins. **Plant Journal**, v. 14, p. 371-379, 1998.
- KONAREV, A. V.; IRINA, N.; ANISIMOVA, V. A., GAVRILOVA, T. E.; VACHRUSHEVA, G. YU.; MERVYN L. SHEWRY, P. R. Serine proteinase inhibitors in the compositae: distribution, polymorphism and properties. **Phytochemistry**, v. 59, p. 279-291, 2002
- KRAUCHENCO, S.; PANDO, S.C.; MARANGONI S. AND POLIKARPOVA, I. Crystal structure of the Kunitz (STI)-type inhibitor from *Delonix regia* seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 312, p. 1303-1308, 2003.
- LASKOWSKI, M. JR. & KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 685-693, 1980.
- LASKOWSKI, M. JR. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Plenum Press: New York, 1983.
- LASKOWSKI, M. JR.; QUASIM, M. A. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? **Biochemical Biophysical Acta**, v. 1477, p. 324-337, 2000.
- LORENZI, H. *Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de Plantas*. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 1992.
- LORITO, M.; BROADWAY, R. M.; HAYES, C. K.; WOO, S. L.; NOVIELLO, C.; WILLIAMS, D. L., HARMAN, G. E. Proteinase inhibitors from plants as a novel class of fungicide **Mol. Plant. Microbe. Interact**, v. 7, p. 525-527, 1994.

LOWRY O. H.; ROSEBROUGH N.J.; FARR A.L.; RANDALL R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biology Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MACEDO, M. L. R.; MATOS, D. G.; MACHADO, O. L. T.; NOVELLO, J.C. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. **Phytochemistry**, v. 54, p. 553-558, 2000.

MELLO, G. C.; OLIVA, M. L. V.; SUMIKAWA, J. T.; MACHADO, O.L.T.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C.; MACEDO, M. L. R. Purification and characterization of a new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* Seeds. **Journal of Protein Chemistry**, v. 20, p. 625-632, 2002.

MANONMANI, G.; BHAVAPRIYA, V.; KALPANA, S.; GOVINDASAMY, S.; APPARANANTHAM, T. Antioxidant activity of *Cassia fistula* (Linn.) flowers in alloxan induced diabetic rats. **Journal Ethnopharmacol**, v. 97, p. 39-42, 2005.

MORENO, J.; CHRISPEELS, A. J. A lectin gene encodes the alpha-amylase inhibitor of the common bean. **Proc. Nat, Acad. Science**, v. 86. p. 7855-7889, 1989.

MORHY, L.; VENTURA, M. M. The complete amino acid sequence of the *Vigna unguiculata* (L.) Walp. seed trypsin and chymotrypsin inhibitor. **Academia Brasileira de Ciência**, v. 59, p. 71-81, 1987.

MORIYAMA, H.; IIZUKA, T.; NAGAI, M.; MIYATAKA, H.; SATOH, T. Antiinflammatory activity of heat-treated *Cassia alata* leaf extract and its flavonoid glycoside. **Yakugaku Zasshi**, v. 123, n. 7, p. 607-611, 2003a.

MORIYAMA, H.; IIZUKA, T.; NAGAI, M.; HOSHI, K. Adenine, an inhibitor of platelet aggregation, from the leaves of *Cassia alata*. **Biol Pharm Bull.**, v. 26, n. 9, p. 1361-1364, 2003.

NEGREIROS, A. N. M.; CARVALHO, M. M.; XAVIER-FILHO, J.; BLANCO-LABRA, A.; SHEWRY, P. R.; RICHARDSON, M. The complete amino acid sequence of the major Kunitz trypsin inhibitor from the seeds of *Prosopis juliflora*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 2829-2837, 1991.

NEURATH, H. The regulation of proteinase action. In: Avilés, F. X. **Innovations in protease and their inhibitors**. New York, Walter De Gruyter, p. 3 -12, 1989.

NORIOKA, S.; IKENAKA, T. Amino acid sequence of a trypsin-chymotrypsin inhibitor, B-III, of peanut (*Arachis hypogaea*). **Journal of Biochemistry**, v. 93, p. 479-485, 1983.

ODANI, S.; IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitors IV. Complete amino acid sequence and the anti-proteinase sites of Bowman-Birk soybean proteinase inhibitor. **Journal of Biochemistry**, v. 71, p. 839-848, 1972.

OLIVA, M. L. V.; JULIANO, C. R.; CHAGAS, M. A.; ROSA, J. R.C.; GREENE, L. J.; SAMPAIO, M. U.; SAMPAIO, C. A. M. Characterization of a tissue kallikrein inhibitor isolated from *Bauhinia bauhinioides* seeds: inhibition of the hydrolysis of kininogen related substrates. **Immunopharmacology**, v. 45, p. 163-169, 1999.

- OLIVA, M. L. V.; SOUZA-PINTO, J. C.; BATISTA, I. F. C.; ARAÚJO, M. S.; SILVEIRA, V. F.; AUERSWALD, E. A.; MENTELE, R.; ECKERSKORN, C.; SAMPAIO, M. U.; SAMPAIO, C. A. M. *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kenin release and rat paw edema. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, p. 64-74, 2000.
- OLIVA, M. L. V.; SANTOMAURO-VAZ, E. M.; ANDRADE, S. A.; JULIANO, M. A.; POTT, V. J.; SAMPAIO, M. U.; SAMPAIO, C. A. M. Synthetic peptides and fluorogenic substrates related to the reactive site sequence of Kunitz-type inhibitors isolated from *Bauhinia*: interaction with human plasma kallikrein. **Biol. Chemistry**, v. 382, p. 109-113, 2001,
- OTLEWSKI, J.; WHATLEY, H.; POLANOWSKI, A.; WILUSZ, T. Amino-acid sequences of trypsin inhibitors from watermelon (*Citrullus vulgaris*) and red bryony (*Bryonia dioica*) seeds. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, v.368, p. 1505-1509, 1987.
- PANDO, S. C.; OLIVA, M. L. V.; SAMPAIO, C. A. M., DI CIERO, L.; NOVELLO, J. C., MARANGONI, S. Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds. **Phytochemistry**, v. 57, p. 625-630, 2001.
- POWERS, J.C.; Asgian, J.L.; Ekici, Ö.C. and James, K.E. Irreversible inhibitors of serine, cysteine and threonine proteases. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 4639-750, 2002.
- RAMASARMA, P. R.; RAO, A. G. A., RAO, D. R. Role of disulfide linkages in structure and activity of proteinase inhibitor from horsegram (*Dolichos biflorus*). **Biochim. Biophysical Acta**, v. 1248, p. 35-42, 1994.
- RICHARDSON, M.; BARKER, R. D. J.; MCMILLAN, R. T. Re-examination of the molecular weight of chymotryptic inhibitor I from potatoes **Biochem, Soc. Trans.**, v. 4, p. 1077-1079, 1976.
- RICHARDSON, M. The proteinase inhibitors of plants and micro-organisms. **Phytochemistry**, v. 16, n. 3, p.159-169, 1977.
- RICHARDSON, M.; CAMPOS, F. A.; XAVIER-FILHO, J.; MACEDO, M. L. R.; MAIA, G. M. C.; YARWOOD, A. The amino acid sequence and reactive (inhibitory) site of the major trypsin isoinhibitor (DE5) isolated from seeds of the Brazilian Carolina tree (*Adenanthera pavonina* L.). **Biochim. Biophysical. Acta**, v. 872. p. 134-142, 1986.
- RICHARDSON, M. Seeds storage proteins: The enzyme inhibitors. In : Rogers, L. J. (Ed), **Methods in Plant Biochemistry**, Amino Acids, Proteins and Nucleic Acids, Academic Press, new York, v. 5, p. 595-305, 1991.
- RYAN, C. A. Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. **Annual Review Phytopathology**, v. 28, p. 425-449, 1990.
- RYAN, S. N.; LAING, W. A.; MCMANUS, M. T. A cysteine proteinase inhibitor purified from apple fruit. **Phytochemistry**, v. 49, n. 4, p.953-963, 1998.

- RYAN, S. N.; MCMANUS, M. T.; LAING, W. A. Identification and characterization inhibitors and their genes from seeds of apple (*Malus domestica*). **Journal Biochemistry**, v. 134, p. 31-42, 2003.
- 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. Plant serine proteinase inhibitors. Structure and biochemical applications on plasma Kallikrein and related enzymes. **Immunopharmacology**, v. 32, p.62-66, 1996.
- SCHNEBERLI, HP P.; BRAUN, N. J. **Proteinase inhibitors as drugs. In proteinase Inhibitors** (Barrett, A. J. & Salvesen, G., eds) p. 613-627, Elsevier, Amsterdam. 1986.
- SEELMEIER, S.; SCHMIDT, H.; TURK, V.; VON DER HELM K. Human immunodeficiency virus has an aspartic-type protease that can be inhibited by pepstatin A. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 18, p. 6612-6616, 1988.
- SEEMULLER, U.; EULITZ, M.; FRITZ, H.; STROBL, A. Structure of the elastase-cathepsin G inhibitor of the leech *Hirudo medicinalis*. **Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chemistry**, v. 361, p. 1841-1846, 1980.
- SEGUNDO, B. S. Role of proteolytic enzymes in specific developmental processes in plants. Avilés F. X. **Innovations in protease and their inhibitors**. New York, Walter De Gruyter, p. 349-367, 1993
- SHEWRY, P. R.; LUCAS, P. R. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. **Adv. Bot. Res.**, v. 26, p. 135-192, 1997.
- SHIBATA, H.; HARA, S.; IKENAKA, T. Purification and characterization of proteinase inhibitors from winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* L.) seeds. **Journal Biochemistry**, v. 99, p. 1147-1155, 1986.
- SILVA, J.A.; MACEDO, M.L.R.; NOVELLO, J.C. AND MARANGONI, S. Biochemical Characterization and N-Terminal Sequences of Two New Trypsin Inhibitors from *Copaifera langsdorffii* Seeds. **Journal of Protein Chemistry**. v. 20, n. 1, 2001.
- SIMÕES, I. AND FARO, C. Structure and function of plant aspartic proteinases. **Eur. J. Biochem.** v. 271, p. 2067-2075, 2004.
- SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Anal Biochem.**, v. 287, n. 2, p. 252-260, 2000.
- SOUZA, E. M.T.; MIZUTA, K.; SAMPAIO, C. A. M.; SAMPAIO, M. U. Purification and partial characterization of a *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor. **Phytochemistry**, v. 39, p. 521-525, 1995.
- TAN, C. G. L.; STEVENS, F. C. Amino acid sequence of lima bean protease inhibitor component IV. Isolation and sequence determination of the tryptic peptides. **European Journal Biochemistry**, v. 18, p. 503-514, 1971.

- TELES, R. C. L.; SOUZA, E. M. T.; CALDERON, L. A.; FREITAS, S. M. Purification and pH stability characterization of a chymotrypsin inhibitor from *Schizolobium parahyba* seeds. **Phytochemistry**, v. 65, p. 793-799, 2004.
- TERRAS, F. R. G.; SCHOOF, H. M. E.; DE BOLLE, M. F. C.; VAN LEUVEN, F.; REES, S. B.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B. P. A.; BROEKAERT, W. F. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. **Journal Biol. Chemistry**, v.5, n. 267, p. 15301-15309, 1992.
- VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Protein inhibitors of proteinases in seeds: 1. classification, distribution, structure, and properties. **Journal of Plant Physiology**, v. 46. n. 3, p. 307-321, 1999.
- VERNEKAR, J. V.; GHATGE, M. S.; DESPANDE, V. V. Alkaline protease inhibitor: A novel class of antifungal proteins against phytopathogenic fungi. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 262, p. 702-707, 1999.
- VIEIRA, D. F. **Isolamento e caracterização do cDNA, produção heteróloga e análise estrutural de BbKI: um inibidor de proteinase de *Bauhinia bauhinoides***. 2004. 91 p. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
- WARSHEL, A.; NARAY-SZABO, G.; SUSSMANT, F. HWANG, J-K. How do serine proteases really work? **Biochemistry**, v. 28, p. 3629-3637, 1989.
- WIECZOREK, M.; OTLEWSKI, J.; COOK, J.; PARKS, K.; LELUK, J.; WILIMOWSKA-PELC, A. The squash family of serine proteinase inhibitors. Amino acid sequences and association equilibrium constants of inhibitors from squash, summer squash, zucchini, and cucumber seeds. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v, 31, n.126, p. 646-652, 1985.
- WILIMOWSKA-PELC, A.; DRYJANSKI, M.; ZAL, T.; WILUSZ, T. Metallo-proteinase from the seedlings of kale (*Brassica oleraceae* L. var. *sabellica*): preparation, partial characterization and substrate specificity. **Plant**, v. 185: p. 344-349, 1991.
- WOODY, R. W. The circular dichroism of oriented  $\beta$ -sheets: theoretical predictions. **Tetrahed. Assymm**, v. 4, p. 529-544, 1994.
- WOODY, R. W.; DUNKER, A. K. Aromatic and cystine side-chain circular dichroism in proteins. In: FASMAN, G.D. **Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules**. Plenum Press: New York, 1994. p. 109-157.
- Wu, H. C.; Lin, J. Y. The complete amino acid sequence of a Kunitz family trypsin inhibitor from seeds of *Acacia confuse*. **Journal Biochemistry**, v. 113,p.258-263, 1993.
- XAVIER-FILHO, J. The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants. **Revista Brasileira de fisiologia vegetal**, v. 4, p. 1-6, 1992.
- YANG, Y. C.; LIM, M. Y.; LEE, H. S. Emodin isolated from *Cassia obtusifolia* (Leguminosae) seed shows larvicidal activity against three mosquito species. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, p. 7629-31, 2003.

**INTERNET**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://clustalw.genome.jp>

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)