

José Xavier Filho

Estudos sobre Inibidores de Tripsina em Plantas

N.Cham T574.192 X19e T

Autor: Xavier Filho, José

Título: Estudos sobre inibidores de trip



1332090

Ac. 47412

BCT

FORTALEZA, 1980

ESTUDOS SOBRE INIBIDORES DE TRIPSINA EM PLANTAS

JOSÉ XAVIER FILHO

Tese apresentada como exigência parcial para o
Concurso de Professor Titular

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CENTRO DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FORTALEZA, CEARÁ
1980

UFC/BU/BCT 03/10/2000



R1332090 Estudos sobre inibidores de
C644579 tripsina em
T574.192 X19e

AGRADECIMENTOS

A todos os colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular sou grato pela convivência amigável.

Sou grato aos colegas Iracema Lima Ainouz, Renato de Azevedo Moreira, Francisca Denize Nogueira de Souza e Joseph Francis Carasco pela valiosa colaboração recebida.

Minha gratidão se estende a André Newton do Monte Negreiros, Maria Ary Ruschel, Afrânio Neri Coelho, Francisco de Assis de Paiva Campos, Geruza Maria Caldas Maia, Ana Lúcia Serra Lopes, José Jairo de Melo Costa e Marilena Bezerra Jucá que, na qualidade de estudante de pós-graduação ou bolsistas de iniciação científica foram de importância inestimável para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) agradeço o apoio ao meu trabalho através da concessão de auxílios e bolsa de Pesquisador.

ÍNDICE

RELAÇÃO DE FIGURAS	VII
RELAÇÃO DE TABELAS	XI
RELAÇÃO DE QUADROS	XII
ABREVIATURAS	XIII
RESUMO	XIV
PARTE I - INTRODUÇÃO	1
1. Generalidades	1
2. Importância	2
a. Influência no valor nutritivo de mate- riais vegetais	3
b. Interação de inibidores de tripsina com a enzima	3
c. Possível potencial farmacológico	4
d. Papéis fisiológicos	5
d1. Controle da atividade de proteinases endógenas	5
d2. Proteção contra interrupção acidental da estrutura sub-celular	6
d3. Proteção contra a ação de insetos e microorganismos	6
d4. Mecanismo de dispersão de sementes ..	7
d5. Proteínas de reserva	8
3. Objetivos	9
PARTE II - MÉTODOS	10
1. Introdução	10
2. Métodos quantitativos de análise	11
a. Ensaio caseinolítico de Kunitz	15
b. Ensaio azo-caseinolítico	23
c. Ensaio tendo BAPA como substrato	28
3. Métodos qualitativos	36
a. Eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,1	37

b. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS	42
c. Focalização isoelétrica em placas de gel de poliacrilamida	45
d. Separação em duas dimensões	52
4. Métodos de preparação	55
a. Cromatografia em trocadores de íons	58
a1. DEAE-celulose	58
a2. SP-Sephadex	59
b. Métodos de afinidade	64
b1. Sepharose-4B-tripsina	67
b2. Sepharose-4B-quimiotripsina	67
b3. Sepharose-4B-anidro tripsina	76
PARTE III - INIBIDORES DE TRIPSINA EM SEMENTES	84
1. Introdução	84
2. Estudos iniciais	85
a. Estudos em leguminosas	92
3. Estudos em sementes nativas ou adaptadas do Nordeste	101
PARTE IV - INIBIDORES EM <u>Vigna unguiculata</u>	105
1. Introdução	105
a. Aspectos botânicos e importância comercial	105
b. Primeiros estudos sobre inibidores no gênero <u>Vigna</u>	106
2. Concentração	110
3. Multiplicidade	113
4. Localização	124
5. Metabolismo	133
PARTE V - CONCLUSÕES	151
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157

RELAÇÃO DE FIGURAS

Fig. 1. Curvas de inibição para três inibidores com diferentes constantes de associação	14
Fig. 2. Curva de inibição hipotética obtida pelo método caseinolítico de Kunitz	20
Fig. 3. Esquema de uma curva de inibição mostrando as variáveis utilizadas para cálculo de unidades de inibidor	22
Fig. 4. Curva de inibição de tripsina por extrato bruto de <u>Adenantha pavonina</u> obtida pelo ensaio azo-caseinolítico	30
Fig. 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,1 do inibidor IT/IQ de <u>Vigna unguiculata</u> cv. seridô	39
Fig. 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida do inibidor de tripsina de <u>Vigna unguiculata</u> cv. seridô a pH 8,1 (A), a pH 8,1 e ureia 8 M (B) e com SDS e β -ME (C)	41
Fig. 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida de extratos brutos de três cultivares de <u>Vigna unguiculata</u> . Coramento de proteína com negro de amido e de inibidores de tripsina e quimiotripsina com APNE como substrato	44
Fig. 8. Eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS dos inibidores de tripsina de soja (Kunitz), de <u>Phaseolus lunatus</u> (LBI) e <u>Vigna unguiculata</u> (IT/IQ)	47
Fig. 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS de extratos de sementes de soja e <u>Vigna unguiculata</u>	49
Fig. 10. Eletrofocalização em placa de gel de poliacrilamida de extratos brutos de sementes de <u>Vigna unguiculata</u> (cultivares seridô, pitiúba, quebra-cadeira e "Red bow")	54

Fig. 11. Separação bi-dimensional de inibidores de tripsina de <u>Vigna unguiculata</u> cv. seridõ	57
Fig. 12. Cromatografia do Inibidor bruto de <u>Vigna unguiculata</u> cv. seridõ em DEAE-celulose.....	61
Fig. 13. Cromatografia do Inibidor bruto de <u>Vigna unguiculata</u> cv. seridõ em DEAE-celulose utilizando um gradiente exponencial de NaCl	63
Fig. 14. Cromatografia do inibidor IT/IQ de <u>Vigna unguiculata</u> cv. seridõ em SP-Sephadex C25.....	66
Fig. 15. Cromatografia de afinidade em Sepharose-4B-tripsina do Inibidor bruto de caju (<u>Anacardium occidentale</u>)	69
Fig. 16. Eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,1 da fração com atividade anti-tríptica do Inibidor bruto de caju retida em Sepharose-4B-tripsina	71
Fig. 17. Cromatografia de afinidade em Sepharose-4B-quimiotripsina de extratos parcialmente purificados de semente de <u>Vigna unguiculata</u> cv. seridõ	73
Fig. 18. Curva de saturação da coluna de Sepharose-4B-quimiotripsina	75
Fig. 19. Cromatografia de afinidade em Sepharose-4B-anidrotripsina de extratos semi-purificados de sementes de <u>Vigna unguiculata</u> cv. seridõ	79
Fig. 20. Cromatografia de afinidade em Sepharose-4B-tripsina de extratos semi-purificados de sementes de <u>Vigna unguiculata</u> cv. seridõ	81
Fig. 21. Eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS de inibidores de tripsina de <u>Vigna unguiculata</u> cv. seridõ separados por meio de cromatografia de afinidade	83
Fig. 22. Gráfico do logaritmo da concentração de inibidores de tripsina versus logaritmo da concentração de proteínas para sementes mostradas na Tabela I	95
Fig. 23. Gráfico do logaritmo da concentração de inibidores	

	de tripsina versus logaritmo da massa da semente em gramas. Sementes da Tabela I	98
Fig. 24.	Curvas de atividade inibitória contra tripsina e atividade proteolítica sobre caseína de extratos de sementes de jaca (<u>Artocarpus integrifolia</u>)	103
Fig. 25.	Sementes de <u>Vigna unguiculata</u> dos diversos cultiva- res utilizados nos estudos relatados neste traba- lho	109
Fig. 26.	Eletrofocalização em placa de gel de poliacrilami- da de albuminas totais, fração solúvel e albuminas de corpos protéicos de <u>Vigna unguiculata</u> var. "Red bow" e albuminas de corpos protéicos e fração solú- vel de <u>Phaseolus vulgaris</u> cv. Processor	118
Fig. 27.	Eletrofocalização em placas de gel de poliacrilami- da de albuminas totais, fração solúvel e albuminas de corpos protéicos de <u>Vigna unguiculata</u> var. "Red bow". As quantidades de proteína aplicadas foram metade das correspondentes mostradas na Fig. 26 ..	120
Fig. 28.	Composição de experiências de filtração em gel de dextrana de extratos de cotilédones germinantes de <u>Vigna unguiculata</u> cv. seridõ	139
Fig. 29.	Efeito do eixo embrionário sobre a atividade anti- trípptica de cotilédones de <u>Vigna unguiculata</u> cv. seridõ durante a germinação	141
Fig. 30.	Atividade anti-trípptica durante a germinação de <u>Vigna unguiculata</u> cv. seridõ, referida a unidades por peso seco	144
Fig. 31.	Atividade anti-quimiotrípptica durante a germinação de <u>Vigna unguiculata</u> cv. seridõ, referida a unida- des por peso seco	146
Fig. 32.	Fotografias em preto e branco de impressões de cor- tes transversais de cotilédones de <u>Vigna unguicula- ta</u> cv. seridõ germinados por 4 dias, sobre gel de agar contendo tripsina e posteriormente tratado pe	

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela I	- Massa de semente, concentração de proteínas e concentração de inibidores de tripsina em sementes de algumas espécies nativas e cultivadas	93
Tabela II	- Atividade anti-triptica de sementes de espécies nativas ou adaptadas, do Nordeste	104
Tabela III	- Inibidores de tripsina em sementes de <u>Vigna unguiculata</u>	111
Tabela IV	- Isoinibidores de <u>Vigna unguiculata</u> . Pontos isoelétricos das diferentes espécies de inibidores de tripsina determinados por focalização isoelétrica	121
Tabela V	- Algumas propriedades de inibidores de tripsina isolados de sementes de <u>Vigna unguiculata</u> .	125
Tabela VI	- Composição de aminoácidos de inibidores isolados de sementes de <u>Vigna unguiculata</u>	126
Tabela VII	- Distribuição de proteína, atividade anti-triptica e peso fresco em <u>Vigna unguiculata</u> cv. seridô	129
TABELA VIII	- Atividades anti-triptica e anti-quimiotriptica de diferentes partes das sementes de <u>Vigna unguiculata</u> cv. seridô durante a germinação .	142

ABREVIATURAS

AN-T	-	anidro tripsina
APNE	-	acetil-DL-fenilalanina- β -naftil ester
BAPA	-	α -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida
DMS	-	dimetil sulfóxido
I	-	inibidor
IB	-	inibidor bruto
β -ME	-	β -mercapto etanol
NPGB	-	p-nitrofenil-p-guanidino benzoato
PMS	-	fenilmetilsulfonil
Q	-	quimiotripsina
SDS	-	dodecil sulfato de sódio
T	-	tripsina
TCA	-	ácido tricloro acético
TEA	-	trietanolamina
TF	-	tampão fosfato
TLCK	-	p-toluenosulfonil clorometil cetona
UI	-	unidade de inibidor

RESUMO

Em nossas investigações, baseadas nas tentativas de contribuir para o conhecimento da função ou funções que os inibidores de tripsina exercem nas plantas, desenvolvemos ou modificamos técnicas para seu estudo, verificamos sua distribuição em um razoável número de sementes nativas além de termos estudado sua mobilização em sementes de Vigna unguiculata cv. seridõ durante a germinação.

Métodos analíticos tão sensíveis como a focalização isoelétrica e a eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS, acoplados com o método de coramento negativo, utilizando o substrato sintético N-acetil-DL-fenilalanina- β -naftil ester, nos permitiram constatar a multiplicidade de formas de inibidores de tripsina tanto em Vigna unguiculata como em outras sementes.

Mostramos, por outro lado, que existe uma enorme variação (de 0,0002% a 6%) nas concentrações de inibidores de tripsina em sementes, parecendo haver uma leve dependência dessa concentração na concentração de proteínas.

Os estudos em Vigna unguiculata mostraram haver uma distribuição preferencial de inibidores na semente antes da germinação; foi detectado um gradiente de inibidores que cresce a partir das porções distais do cotilédone culminando em uma concentração até 3 vezes maior no eixo embrionário. Os inibidores parecem ter sua mobilização nos cotilédones retardada com relação às proteínas totais; esta mobilização cotiledonária contrasta com o que acontece no eixo, aonde a partir do 5º dia de germinação parece haver um acúmulo no epicótilo-plúmulas.

Os nossos resultados quando examinados conjuntamente

com uma grande quantidade de informação existente sobre os inibidores de tripsina e inibidores de proteinases de um modo geral, nos levaram a propor no presente trabalho que os inibidores de tripsina fazem parte de uma classe de substâncias, comumente encontrada em plantas, caracterizada por possuírem baixo peso molecular (geralmente em torno de 10.000 daltons), ponto isoelétrico baixo, alto teor de cistina e aminoácidos ácidos, geralmente resistente ao calor e a ação de enzimas proteolíticas. Esta classe de proteínas, a par de função ou funções metabólicas mais ativas que não nos foi possível determinar, teriam uma função de reserva especializada muito importante.

PARTE I - INTRODUÇÃO

1. GENERALIDADES

Estudos feitos por Osborne e Mendel em 1917 mostraram haver aumento do valor nutritivo de soja quando esta era tratada pelo calor (1). A busca da substância ou substâncias termolábeis responsáveis por esse aumento levou à descrição, em 1938, por Read e Haas, de uma proteína encontrada em farinha dessa leguminosa e capaz de inibir a ação de tripsina (2). Estes estudos em soja culminaram, em 1945-1947, com o isolamento e cristalização de um inibidor de tripsina e de seu complexo com a enzima (3, 4). Investigações anteriores haviam indicado, por outro lado, a possibilidade de existência de mais de um inibidor em sementes de soja (5). A presença daquelas substâncias parecia uma explicação lógica para o baixo valor nutritivo dessas sementes e seu aumento após aquecimento. Esta idéia básica foi imediatamente utilizada para explicar o baixo valor nutritivo de grãos secos e verdes e tubérculos quando ingeridos sem tratamento térmico prévio.

Assim é que Borchers, Ackerson e Kimmert estenderam a um número considerável de espécies de leguminosas as observações sobre a presença de inibidores de tripsina (6). Apesar de diversas sementes de cereais terem sido incluídas nesse estudo, os autores não foram capazes de detectar inibidores em nenhuma espécie de gramínea. Foi preciso técnicas mais sensíveis para se chegar a conclusão de que os inibidores de tripsina também estão presentes em sementes dessa família (5). Inibidores de tripsina também foram detectados em duas espécies cujos órgãos normalmente consumidos não são a semente; batata doce (Ipomea batata) e batata (Solanum tuberosum) apresentam altas concentrações de inibidores de tripsina em seus tubérculos (5, 7).

Após estes estudos iniciais ligados à possibilidade de relacionar o teor de inibidores de tripsina em materiais vegetais e o seu valor nutritivo quando ingeridos crus, houve um

interesse acentuado em verificar se essas substâncias exerciam sua atividade contra outras enzimas proteolíticas, principalmente as de tipo serina. Diversas enzimas dessa classe como quimiotripsina, plasmina, elastase, tromboplastina, calicreina, foram capazes de sofrer inibição por muitos inibidores de tripsina isolados de plantas, mostrando dessa maneira ser a inibição dependente da conservação de uma determinada conformação, característica das enzimas desse grupo (7).

É interessante notar que não somente inibidores de enzimas proteolíticas do tipo serina foram encontrados em plantas. Proteínas com a capacidade de inibir a ação de proteínases do tipo sulfidril, metaloproteínases e proteínases ácidas, foram encontradas em materiais vegetais (8).

Inibidores protéicos para enzimas não proteolíticas têm sido também freqüentemente encontrados em plantas (7); este é o caso dos inibidores de α -amilase encontrados em diversos cultivares de Phaseolus vulgaris por Jaffé (9).

A maior parte desses inibidores protéicos de plantas tem algumas propriedades em comum. São proteínas de peso molecular em geral da ordem de 10.000 daltons e normalmente se associam formando dímeros, trímeros e tetrâmeros (8). São geralmente resistentes a ação de diversos agentes desnaturantes, como altas temperaturas a baixos pHs, altas concentrações de uréia e também à ação de enzimas proteolíticas (8). Análise de aminoácidos indica, na maior parte dos casos, uma alta percentagem de cistina e de ácidos aspárticos e glutâmico (5, 7, 8, 10, 11, 17).

2. IMPORTÂNCIA

Devido ao aparente caráter de curiosidade em que são envolvidos os inibidores protéicos de plantas, principalmente os inibidores de tripsina, sempre houve uma preocupação dos investigadores interessados nessas substâncias em enfati-

zar sua importância. Não fugindo ao costume, podemos dizer que os estudos sobre inibidores de tripsina de plantas têm grande importância dos pontos de vista nutricional, físico-químico, farmacológico e fisiológico.

2a. Influência no valor nutritivo de materiais vegetais

Após os estudos iniciais referidos acima, ligados ao possível papel negativo na nutrição, e que deram origem à vasta literatura sobre inibidores de tripsina em plantas, aparentemente se chegou a um consenso de que os inibidores de tripsina têm uma significação menor para a nutrição (13). Esta ausência de significação parece ser decorrência do fato de que tripsina humana não é inibida ou o é fracamente pelos inibidores de tripsina de plantas, normalmente testados com tripsina de origem bovina. Embora talvez sem importância para a nutrição humana, os estudos com ratos, principalmente, parecem ter mostrado que os inibidores de tripsina são responsáveis, pelo menos em parte, pelo baixo valor nutritivo de farinha de soja para esses animais; este baixo valor nutritivo é aparentemente reflexo de complexação de tripsina. Esta complexação, causando a diminuição dos níveis de enzima, estimularia o pâncreas a produzir mais tripsina (e outras proteínas) provocando uma hipertrofia do órgão; as necessidades de aminoácidos para esta síntese aumentada, exigiria níveis elevados de aminoácidos, principalmente os sulfurados, normalmente deficientes em proteínas vegetais. Dessa maneira os inibidores teriam o efeito duplo de provocar um aumento do volume do pâncreas e uma exaustão de reservas de aminoácidos sulfurados (14).

2b. Interação de inibidores de tripsina com a enzima

Desde os trabalhos pioneiros de Kunitz os inibidores de tripsina tornaram-se importantes para o estudo dos processos de interação proteína-proteína e enzima-substrato (12). Os inibidores se combinam estequiometricamente com a enzima for-

mando complexos 1:1 cujas constantes de dissociação são extremamente baixas, da ordem de 10^{-8} - 10^{-10} M. A dissociação desses complexos é dependente de pH, havendo dissociação em enzima e inibidor quando a acidez do meio é alta.

Laskowski, Jr. e colaboradores sugeriram que a formação desses complexos era devida a ação da enzima sobre uma ligação peptídica específica na molécula do inibidor, formando uma acil-enzima, acompanhada de hidrólise da ligação peptídica (12). Os inibidores de tripsina foram então classificados de acordo com o resíduo envolvido nessa ligação, como sendo do tipo arginil ou lisil; inibidores de outras enzimas (e.g. quimiotripsina) puderam também ser classificados de acordo com o resíduo envolvido na formação do complexo.

Esta explicação para a formação do complexo, no entanto, é disputada por outros investigadores (15) que demonstraram não haver necessidade de catálise para sua formação; enzima cataliticamente inativa, como anidro tripsina, é capaz de formar complexos, com os inibidores aparentemente com as mesmas características do complexo com a enzima nativa. Estes investigadores sugerem que a força e especificidade da ligação enzima-inibidor deve-se a um número muito grande de ligações não covalentes (8).

2c. Possível potencial farmacológico

É sabido que uma série de processos fisiológicos e patológicos animais são mediados através da ação de enzimas proteolíticas. Processos tais como a coagulação do sangue, a ativação do complemento, choque traumático, pancreatite e enfisema pulmonar podem ser inibidos ou ter sua intensidade diminuída pela administração de inibidores de tripsina pois as enzimas proteolíticas envolvidas são, geralmente, do tipo serina (16). Algumas dessas enzimas, como a calicreína, envolvida nos processos de liberação de cininas no plasma sanguíneo são inibidas por inibidores de tripsina de plantas, como o inibi-

dor de soja (Kunitz) (16) e um inibidor extraído de amendoim (10). O potencial terapêutico dos inibidores de proteinases de plantas e em especial dos inibidores de tripsina, no tratamento de afecções como o choque, a pancreatite ou enfisema pulmonar é grande. Este potencial deverá ser bastante limitado na medida em que a antigenicidade dos inibidores for alta. É interessante notar aqui que um inibidor isolado de pâncreas e pulmão de boi, o inibidor polivalente de Kunitz, é utilizado sob diversas marcas comerciais no tratamento desses distúrbios (8).

2d. Papéis fisiológicos

Uma quantidade muito grande de investigações tem sido dedicada ultimamente às tentativas de esclarecimento do papel que os inibidores de proteinases e em especial os inibidores de tripsina exercem nas plantas (8,17). Estas investigações, no entanto, parecem não ter contribuído para retirar desses inibidores o caráter de curiosidades bioquímicas e de sua função as características de um quebra-cabeças (8,17).

Aos inibidores de enzimas proteolíticas de vegetais são atribuídas algumas funções; estas, caracteristicamente, não necessitam ser independentes e as sugestões são amiúde de que os inibidores possam exercer mais de uma das funções que lhes são atribuídas (17).

2d.1. Controle da atividade de proteinases endógenas

Em algumas sementes como as de alface, centeio, arroz, cevada, feijão de corda (8) bem como em tubérculos de batata (17) foi mostrada a presença de inibidores de enzimas proteolíticas endógenas. Acredita-se que esses inibidores mantenham essas enzimas em um estado inativo nos órgãos quiescentes e que durante a germinação os complexos sejam desfeitos e as enzimas assim liberadas exerçam sua função na mobilização de reservas protéicas enquanto os inibidores desaparecem (8). Apesar dessas indicações de um papel de controle, a grande

maioria dos inibidores de sementes não é capaz de inibir proteínases endógenas.

2d.2. Proteção contra disrupção acidental da estrutura sub-celular

Os corpos protéicos presentes nos tecidos de reserva de sementes foram comparados aos lisossômos de células animais como sendo os repositórios das enzimas hidrolíticas responsáveis pela mobilização das reservas neles contidas (18). A liberação de constituintes hidrolíticos dos corpos protéicos, principalmente enzimas proteolíticas, causaria danos às proteínas citoplasmáticas. Os inibidores de proteínases, incluídos os inibidores de tripsina, localizados no citoplasma, protegeriam as proteínas contra essa ação. Evidências para este papel são ténues mesmo porque uma localização exclusivamente citoplasmática para os inibidores não está confirmada. Chrispeels e Baumgartner sugeriram que esse papel de proteção seria desempenhado pelo inibidor específico de uma endopeptidase sintetizada "de novo" durante a germinação de Vigna radiata (19).

2d.3. Proteção contra a ação de insetos e microorganismos

Um dos mais interessantes papéis atribuídos aos inibidores de proteínases de um modo geral é o de proteção dos tecidos vegetais contra o ataque de insetos e microorganismos. Ryan (17) e Richardson (8) sumarizaram as evidências encontradas por diversos investigadores e que indicam realmente a possibilidade de controle de pragas por meio desses inibidores.

Estudos interessantes foram realizados por Birk e colaboradores (ver referências 8 e 17) sobre enzimas proteolíticas larvais de Tribolium confusum e Tribolium castaneum, pragas comuns de grãos armazenados; embora não tenham encontrado inibição dessas proteínases pelos inibidores de tripsina, mostraram a existência de inibidores específicos para essas enzi

mas em soja e trigo. Em Tenebrio mollitor, outra praga de grãos estocados, foi possível demonstrar a presença de enzimas tipo tripsina e que são inibidas por inibidores de tripsina típicos, de origem vegetal.

Ryan e colaboradores (17) trabalhando com plantas da família Solanaceae mostraram que folhas dessas plantas quando atacadas por insetos (ou mecanicamente afetadas) acumulam inibidores de quimiotripsina em altas concentrações; observaram que, se o ataque é feito a uma única folha, o inibidor se acumula em folhas não atacadas da planta. Este fato levou Ryan a lançar a hipótese da existência de um hormônio capaz de induzir a síntese desse inibidor (e também de outras proteínas). Este hormônio foi purificado mas ainda não caracterizado. Ryan propõe uma semelhança desse sistema com os mecanismos de defesa imunológicos.

Mosolov e colaboradores, trabalhando com dois fungos fitopatogênicos, Fusarium solani (20) e Colletotrichium lindemuthianum (21), mostraram que proteínas secretadas pelo primeiro são inibidas por inibidores de tripsina de origem vegetal enquanto que o segundo produz uma protease que é especificamente inibida por um inibidor isolado de sementes de Phaseolus vulgaris.

É oportuno chamar a atenção para o fato de que, aparentemente, não somente inibidores de proteinases estão envolvidos nestes mecanismos de proteção. Um inibidor específico para α -amilase de Tenebrio mollitor foi detectado em sementes de trigo, por Shainkin e Birk (22).

2d.4. Mecanismo de dispersão de sementes

Recentemente Richardson especulou sobre o possível papel dos inibidores de proteinases na dispersão endozóica de sementes; a presença de altas concentrações desses inibidores e mesmo de inibidores de outras enzimas digestivas, como α -amilase, em sementes teria o efeito de protegê-las durante a pas-

sagem através do trato digestivo de animais conhecidos por excretarem sementes viáveis (8); evidências para esse papel, entretanto, são inexistentes.

2d.5. Proteínas de reserva

Se aceitarmos a sugestão de Derbyshire et al. (23) de que toda proteína que seja característica da semente e que exista em uma proporção superior a 5% da proteína total, seja uma proteína de reserva, muitos dos inibidores de proteinases e em particular os inibidores de tripsina, devem ser considerados como tais. Teores de inibidores da ordem de 10% da proteína solúvel de sementes são comumente encontrados (17); resultados de nosso laboratório mostram que sementes de Adenantha pavonina possuem cerca de 1/4 de sua proteína solúvel na forma de inibidores de tripsina.

Não somente os altos teores de inibidores em sementes apontam para seu papel como proteína de reserva. Evidências muito fortes e que suportam esse papel têm sido apresentadas. Ainda Ryan (17) e Richardson (8) conseguiram sumarizar estas evidências em suas revisões sobre inibidores de proteinases em plantas. O acúmulo de inibidores na semente durante a maturação e seu desaparecimento durante a germinação são fatos constatados em muitas espécies (8,17,24,25,26).

Os trabalhos de Ryan e colaboradores (17) sobre a distribuição espacial e temporal do inibidor I de quimiotripsina de batata mostrando um decréscimo nos tubérculos e um acúmulo nos tecidos vegetativos e uma inversão dessa distribuição quando a planta inicia a formação de tubérculos, aponta fortemente para esse papel de reserva.

Em alguns casos foi observado que a mobilização dos inibidores durante a germinação parece não acompanhar a das proteínas de reserva principais (24,25,27,28). Esta diferença de comportamento parece ser reflexo das diferenças em composição de aminoácidos das duas classes; sendo os inibidores de

proteínases normalmente ricos em aminoácidos sulfurados, estas proteínas poderiam exercer um papel de reserva especializado, como foi originalmente proposto por Pusztai (27).

3. OBJETIVOS

Os inibidores de tripsina têm sido considerados como curiosidades bioquímicas (17) devido às suas propriedades e seu estudo foi aparentemente relegado a um plano secundário após a constatação de que seu papel na nutrição humana não é tão importante (13). Suas funções nas plantas não foram, entretanto, até hoje totalmente esclarecidas.

O conhecimento dessas funções nos parece bastante importante tanto do ponto de vista acadêmico como do ponto de vista agrônomo. No primeiro caso o interesse estaria em localizar a participação de um grupo de substâncias nos processos bioquímicos e fisiológicos vegetais. No segundo, a possibilidade de alterar geneticamente esta participação, criando cultivares de espécies econômicas que sejam resistentes a pragas ou ricos em aminoácidos sulfurados.

Nossas investigações sobre inibidores de tripsina, das quais o presente trabalho é um apanhado, tiveram o objetivo de contribuir para o esclarecimento do papel que eles exercem nas plantas, isto é, foram sempre dirigidos para a tentativa de obter respostas para a pergunta: Qual seria o papel ou papéis exercidos pelos inibidores de tripsina nas plantas?

PARTE II - MÉTODOS

1. INTRODUÇÃO

A metodologia empregada para o estudo dos inibidores de enzimas proteolíticas e em particular para os inibidores de tripsina é baseada em métodos enzimáticos de análise e nas metodologias de química e bioquímica de proteínas. É necessário salientar, no entanto que, em virtude de suas propriedades particulares, principalmente seu baixo peso molecular - 8.000 a 10.000 daltons geralmente - devem ser tomadas precauções na adaptação de novos métodos ao estudo dessas proteínas. Um exemplo disso é o fato de que por serem os inibidores geralmente solúveis em ácido tricloroacético a 2,5%, normalmente usado para desproteínização, avaliações de teores de proteína por medida de precipitados obtidos por TCA não podem ser feitas em estudos de inibidores. Essa solubilidade pode chegar também a comprometer a precisão das análises enzimáticas nos métodos baseados na eliminação do substrato protéico não digerido, como é o caso do método de Kunitz (29).

Teores baixos de inibidores em determinados materiais levaram ao desenvolvimento de métodos de avaliação que, embora menos sensíveis que o método de Kunitz, são menos susceptíveis a interferência, proporcionando medidas mais precisas quando os níveis são baixos. Além desse, outros fatores foram importantes no estabelecimento de alguns métodos novos, como a simplificação dos ensaios, muitas vezes demorados e a diminuição dos custos onerados por exemplo, no ensaio de Kunitz, devido ao preço elevado do papel de filtro quantitativo. Assim é que os métodos baseados na hidrólise de azo-caseína (30,31) e de BAPA (α -benzoil - DL - arginina - p-nitroanilida) (32) foram introduzidos com algumas modificações.

O método de coramento negativo utilizando acetil-DL-fenilalanina- β -naftil ester (APNE) (33,34,35), extremamente

sensível pois com seu auxílio podemos detectar inibidores de tripsina em placas de gel de poliacrilamida a um nível de décimo de micrograma, foi de capital importância na demonstração da multiplicidade de inibidores e na avaliação de seus pesos moleculares (35,36).

Dos métodos de preparação saliento a importância evidente dos métodos de afinidade na obtenção rápida de preparações de inibidores com alto grau de enriquecimento. A utilização de enzimas cataliticamente inativas, por outro lado, dá oportunidade adicional de trabalhar com preparações não modificadas enzimaticamente.

2. MÉTODOS QUANTITATIVOS DE ANÁLISE

Os métodos de avaliação quantitativa da atividade anti-triptica utilizados nas investigações aqui descritas são baseados na inibição da hidrólise de um substrato da tripsina por misturas das preparações em estudo com a enzima.

A atividade anti-triptica é essencialmente medida pela diferença entre os graus de hidrólise do substrato por uma quantidade determinada de enzima e uma preparação que contém a mesma quantidade de tripsina acrescida de uma quantidade conveniente de inibidor.

A atividade anti-triptica pode ser expressa de diversos modos. A maneira mais simples de exprimir os resultados é pela percentagem de inibição:

$$\frac{(T) - (T + I)}{(T)} \times 100$$

onde (T) é a velocidade da reação não inibida e (T+I) a velocidade da reação inibida. Esta maneira de expressar a atividade anti-triptica não é conveniente quando, por exemplo, se deseja comparar inibidores de diferentes origens e que podem apresen-

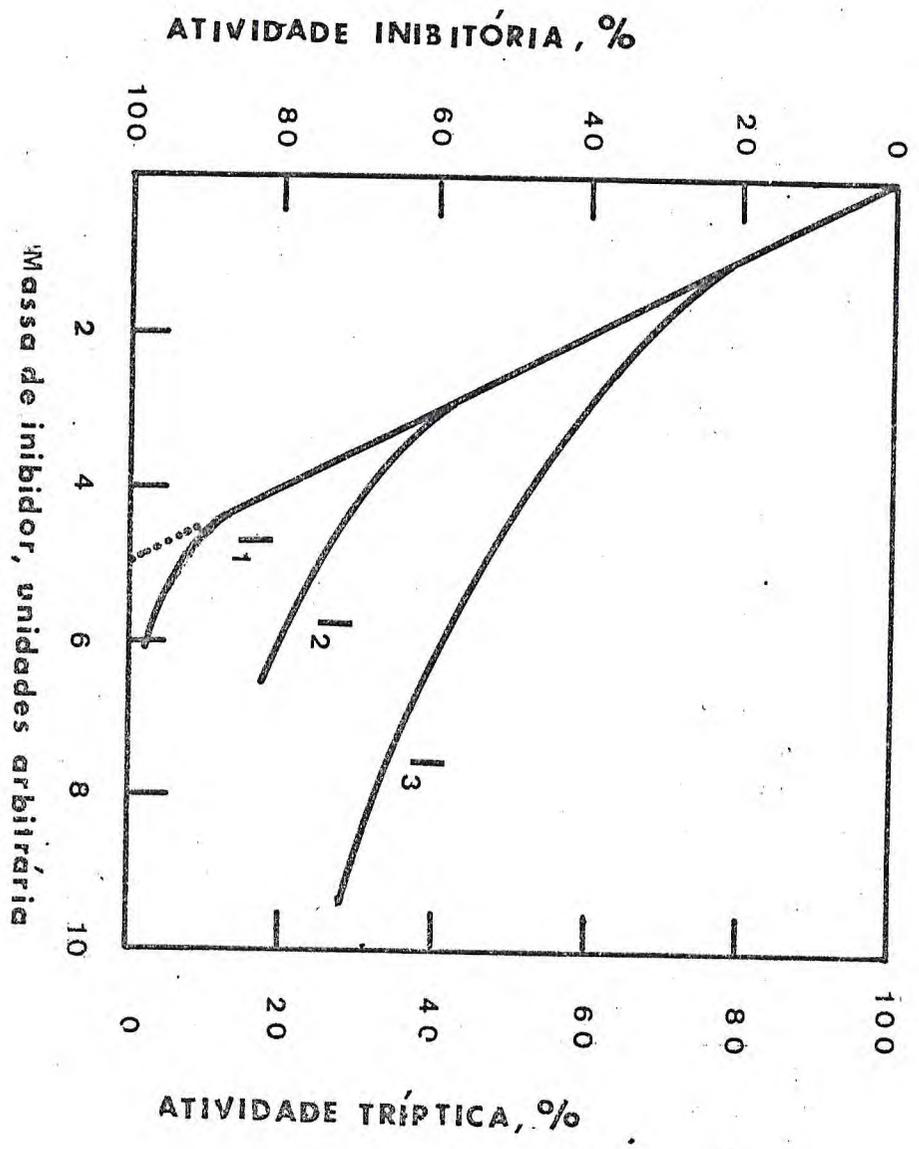
tar constantes de associação diferentes.

A Figura 1 mostra que uma mesma percentagem de inibição é atingida com diferentes quantidades de três inibidores diferentes mas que guardam a mesma relação estequiométrica com a enzima; o que os distingue são as constantes de associação diferentes ($K_1 > K_2 > K_3$).

A atividade anti-tríptica é mais convenientemente expressa quando se toma como índice não a percentagem de inibição mas a quantidade de inibidor capaz de reduzir à metade a atividade da amostra padrão de tripsina. Esta quantidade calculada a partir de curvas de inibição como as mostradas na Figura 1 onde as tangentes aos pontos iniciais são utilizadas para se calcular a mesma quantidade dos três inibidores capaz de inibir a metade da enzima presente.

Uma dificuldade que sempre surge na determinação quantitativa de inibidores em preparações não purificadas (e.g. os chamados extratos brutos) é a presença de atividades enzimáticas que hidrolizam o substrato empregado. Nestes casos a necessidade de provas em branco para eliminação desta fonte de erro na determinação é imprescindível. Por outro lado, estas experiências podem levar à descoberta de atividades hidrolíticas antes insuspeitas, como o sistema enzima proteolítica-inibidor, encontrado em extratos brutos de jaca mole (Artocarpus integrifolia) (37).

Os métodos de determinação da atividade antitriptica utilizados durante o desenvolvimento deste trabalho foram, com modificações ocasionais, os baseados nos ensaios caseinolítico de Kunitz (29) e azocaseinolítico (30,31) e no método de Erlanger et al. (32) que utiliza o substrato sintético, α -N-benzoyl-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPA).



2a. Ensaio caseinolítico de Kunitz

2a.1. Atividade triptica

A atividade triptica é medida essencialmente pelo método caseinolítico de Kunitz (29). Uma solução estoque de tripsina contendo de 0,100 a 0,500mg/ml é preparada pesando-se tripsina cristalina (Sigma, Merck, etc.) e dissolvendo-se em HCl 0,025 M. A concentração real de proteína é medida pela absorbância em 280 nm, sabendo-se que o fator ótico para tripsina (bovina) é:

$$F \frac{1\text{mg/ml}}{280\text{nm}} = 0,621 (38).$$

Para o ensaio a solução estoque de tripsina é diluída para cerca de 10 - 20 $\mu\text{g/ml}$ com o mesmo HCl 0,0025 M. Volumes crescentes desta solução são pipetados em tubos de ensaio e completados para 1,0 ml com HCl 0,0025 M. Adiciona-se 1,0 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6, a cada tubo. Estes são postos em banho a 37°C e após 10 minutos a reação é iniciada pela adição de 1 ml de caseína a 1% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6. Após 20 minutos a reação é parada pela adição de 3,0 ml de TCA 5% (p/v) e os tubos são retirados do banho. Após 30 minutos de repouso as suspensões são filtradas em papel de filtro quantitativo (9cm de diâmetro, Ederol 4 = S § S 589/3 faixa azul = M.N. 640 d = Whatman 42 = Green 808). Aliquotas de 1,0ml dos filtrados são pipetadas para novos tubos e neutralizadas com 0,05 ml de NaOH 2N. Adiciona-se 5 ml de uma mistura das soluções A e B do reagente de Folin na proporção de 50ml da solução A (NaOH 0,01 N em Na₂CO₃ 2%) e 1 ml da solução B (CuSO₄.5H₂O 0,5%, Citrato de sódio 1,0%). Após 10 minutos adiciona-se 0,5 ml do reagente de Folin propriamente dito, diluído para 1 N (o produto comercial é ca. 2N). Após 15 minutos a absorbância a 750 nm (célula de 1 cm de espessura) é lida.

Provas em branco para as concentrações extremas de tripsina são sempre feitas. Nestes casos a adição de TCA pre-

cede a adição de caseína. Os valores intermediários são obtidos por interpolação gráfica.

O gráfico de velocidade de reação (UDO/20 minutos, a atividade trípica) contra a concentração de tripsina não dá normalmente uma reta (39). Até valores de 0,500, no entanto, a curva pode ser tomada por uma reta o que não causa erros muito grandes. Os valores obtidos (0,500 UDO/3-2 μ g) dependem da pureza da amostra de tripsina.

Uma unidade de atividade trípica é definida como a quantidade de enzima que apresenta nas condições do ensaio uma velocidade de reação de 0,250 UDO/20 minutos.

Protocolo de atividade trípica (pag. 17)

2a.2. Atividade anti-trípica

A atividade anti-trípica é proporcional à diferença entre a atividade trípica (UDO/20 minutos) de uma amostra contendo tripsina e a atividade de amostra(s) contendo inibidor e tripsina, esta em concentração idêntica à da amostra contendo somente tripsina.

A tripsina utilizada deve ser uma solução que produza no ensaio de atividade trípica uma leitura de 0,500 UDO/20 minutos (corresponde a ca. de 3 a 6 μ g de tripsina de preparações normalmente usadas). A solução de inibidor em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6 deve ser de concentração tal, que cerca de 0,5 ml da mesma reduzam para 0,250 UDO/20 minutos a atividade da tripsina. Todo o procedimento, neste caso, é semelhante ao utilizado para a determinação da atividade trípica.

Define-se uma unidade de atividade antitripica, independente da pureza da enzima, a quantidade de inibidor que, nas condições do ensaio, reduz a atividade da enzima de 0,500 UDO/20 minutos para 0,250 UDO/20 minutos (40). Quando a leitu

PROTOCOLO PARA ATIVIDADE TRÍPTICA
(CASEÍNA)

Tubo	Tripsina, ml	HCl 0,0025M, ml	TF 0,1M,pH 7,6 ml		Caseína ml	1%, TCA 5%, ml	Caseína ml	1%;
1	0,1	0,9	1,0		1,0	3,0	-	
2	0,2	0,8	1,0		1,0	3,0	-	
3	0,3	0,7	1,0		1,0	3,0	-	
4	0,4	0,6	1,0		1,0	3,0	-	
5	0,5	0,5	1,0		1,0	3,0	-	
6	0,6	0,4	1,0		1,0	3,0	-	
7	0,7	0,3	1,0		1,0	3,0	-	
8	0,8	0,2	1,0		1,0	3,0	-	
9	0,9	0,1	1,0		1,0	3,0	-	
10	1,0	0,0	1,0		1,0	3,0	-	
B1	0,1	0,9	1,0	Banho a 37°C por 5-10 min	-	3,0	1,0	
B10	1,0	0,0	1,0		-	3,0	1,0	

Tratamento idêntico a partir desta etapa (ver texto).

OBS.: A adição de caseína a cada tubo deve ser regularmente espaçada (p. ex.: a cada 15 segundos).

ra do padrão de tripsina (sem inibidor) é exatamente 0,500 pode-se ler diretamente da curva (Fig. 2) o volume que contém 1 unidade de inibidor. Quando isto não acontece há necessidade de se fazer correções que são baseadas na admissão de que há proporcionalidade entre a quantidade de tripsina e a velocidade (UDO/20 minutos); valores de 0,400 a 0,520 são aceitáveis para a velocidade do padrão em virtude das características da reação de hidrólise de caseína por tripsina (39). Pode-se, ao invés de uma curva completa, como a mostrada, determinar a atividade de amostra(s) contendo inibidor utilizando-se somente um ponto, desde que as velocidades (UDO/20 minutos) não se distanciem muito de 0,250. Neste caso desenvolvemos uma fórmula que facilita os cálculos e à qual se chega facilmente.

A Fig. 3 é um esquema de uma curva de inibição típica e onde estão representadas as variáveis utilizadas na dedução dessa fórmula. B é o volume de solução problema que inibe metade da quantidade de enzima utilizada; b é igual a metade da leitura (UDO/20 minutos) real da enzima utilizada. V é o volume da solução problema contendo inibidor, utilizada no ensaio. x é o volume de solução problema que contém 1 UI, isto é: $x = \text{ml/UI}$; a é igual a UDO/20 minutos (tripsina) - UDO/20 minutos (tripsina + inibidor). O volume corrigido quando a leitura da tripsina não dá exatamente 0,500 é:

$$x = \frac{0,250}{b} \times B \quad (1)$$

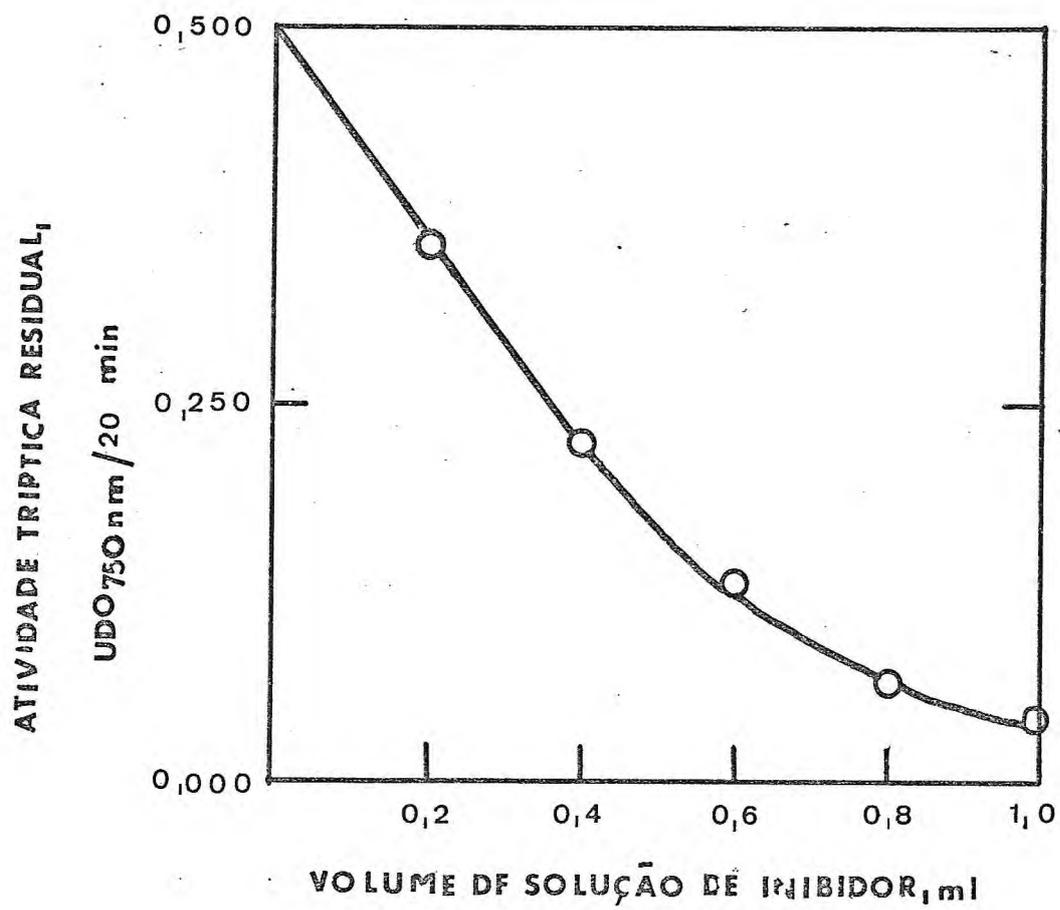
Por equivalência de triângulos vemos que:

$$\frac{V}{B} = \frac{a}{b} \quad \text{donde} \quad B = V \times \frac{b}{a}$$

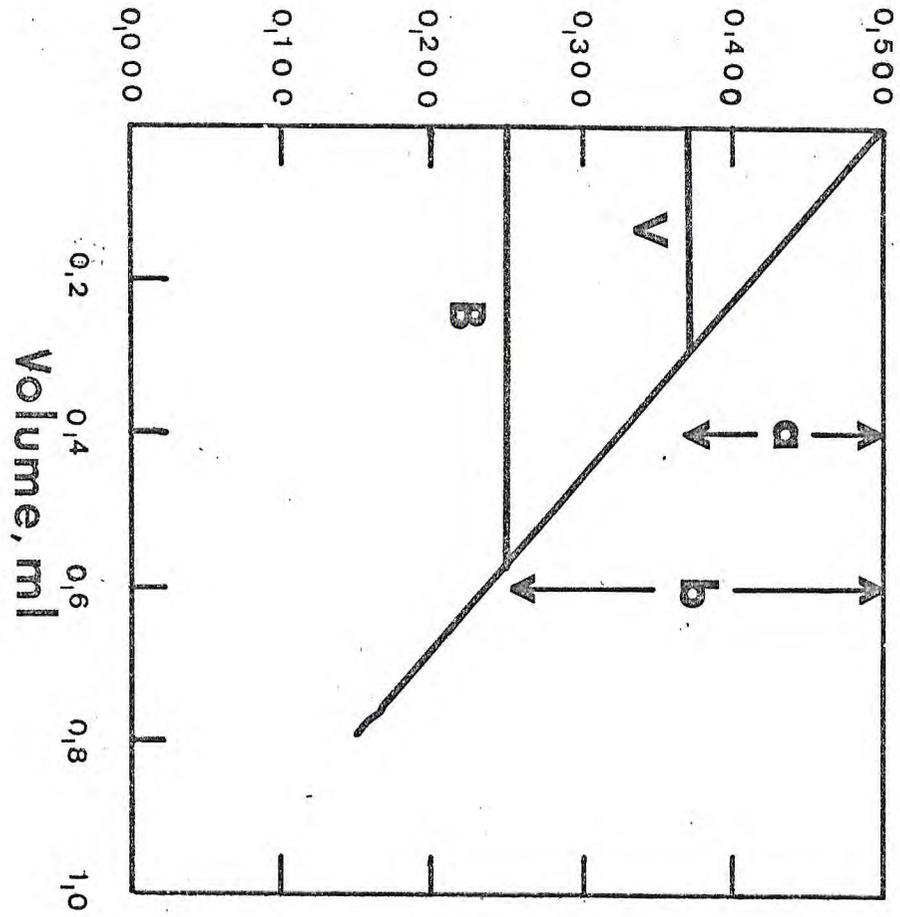
substituindo em (1) temos:

$$x = \frac{0,250}{b} \times \frac{V \times b}{a} = \frac{0,250 \times V}{a} \quad \text{ou}$$

$\text{UI/ml} = \frac{a}{0,250 \times V}$



Velocidade da reação



A unidade de inibidor como definida por nós (40) é independente da pureza da preparação de tripsina e corresponde a cerca de 0,6 µg de inibidor de Vigna unguiculata (que tem um peso molecular de ca. de 10.000 daltons).

Protocolo da atividade anti-tríptica (pg. 24).

2b. Ensaio azo-caseinolítico

A utilização de azo-caseína como substrato para o ensaio de tripsina, apesar de apresentar a mesma sensibilidade do método clássico de Kunitz tem algumas vantagens principalmente de ordem econômica que justificam plenamente seu uso. Essas vantagens são principalmente, o tempo menor necessário à obtenção final do resultado e a economia decorrente do uso de papel de filtro qualitativo, ao invés de quantitativo, como no caso do ensaio caseinolítico. Uma desvantagem do método, no entanto, reside na preparação demorada de azo-caseína. Esta preparação tem que ser cuidadosamente feita de modo que haja confiança na obtenção de um produto final, sempre com as mesmas características.

2b.1. Preparação de azo-caseína

Azo-caseína é preparada de acordo com o método de Goad (31) modificado no laboratório. Uma solução (A), constituída de:

ácido sulfanílico	0,616 g
brometo de potássio	0,084 g
HCl 1 N	45 ml
água destilada	37 ml

é mantida em um banho de gelo, sob agitação. Após equilíbrio térmico adiciona-se, gota a gota, 18 ml de uma solução de ni-

PROTOCOLO PARA ATIVIDADE ANTI-TRÍPTICA
(CASEÍNA)

Tubo	Inibidor ml	TF	0,1M,pH ml 7,6	Tripsina ml	Caseína ml	1%	TCA 5% ml	Caseína ml	1%
1	0,2		1,3	0,5	1,0	Banho a 37°C por 20 minutos	3,0	-	Tratamento idêntico a par- tir desta etapa (ver texto)
2	0,4		1,1	0,5	1,0		3,0	-	
3	0,6		0,9	0,5	1,0		3,0	-	
4	0,8		0,7	0,5	1,0		3,0	-	
5	1,0		0,5	0,5	1,0		3,0	-	
B1	0,2		1,3	0,5	-		3,0	1,0	
B5	1,0		0,5	0,5	-		3,0	1,0	
T	-		1,5	0,5	1,0		3,0	-	
BT	-		1,5	0,5	-	3,0	1,0		

OBS.: A adição de caseína a cada tubo deve ser regularmente espaçada (p. ex.: a cada 15 segundos).

trito de sódio 0,2 M. Deixa-se a solução final, ácido diazo-sulfanílico, em banho de gelo (0°C) em agitação por 15 min. Prepara-se uma solução de caseína a 2% em NaOH 0,1 N ajustada a pH 10 e resfriada em banho de gelo. Adiciona-se a solução de diazo-sulfanílico, gota a gota, à solução de caseína 2%. A reação se processa em um banho de gelo e o pH é mantido em torno de 10 pela adição de NaOH 1 N. Após adição total do ácido diazo-sulfanílico mantém-se a mistura sob agitação por 15 minutos a 0°C quando então a reação é parada pela adição de HCl 1 N e o pH ajustado a 7,0. A solução de azo-caseína é dialisada contra NaCl 0,1 M, por 24 horas e contra água destilada por mais 24 horas. À solução dialisada é adicionado TCA 100%, sob agitação, de tal modo que a suspensão fique com uma concentração final de 2,5% do ácido. Deixa-se essa suspensão em repouso por 16 horas, filtra-se sob vácuo e lava-se o produto com TCA 2,5% (cerca de 1 litro). O produto obtido é ressuspenso em 150 ml de água destilada, dialisado contra água por 16 horas e liofilizado. Obtem-se desse modo uma preparação de azo-caseína, solúvel em toda a faixa de pH e insolúvel em TCA 2,5%. Os rendimentos com relação a caseína são da ordem de 90%.

2b.2. Atividade trípica

Volumes crescentes de uma solução de tripsina bovina contendo 10 $\mu\text{g/ml}$ (ver ensaio caseinolítico) em HCl 0,0025 M são pipetados para tubos de ensaio e o volume completado para 1 ml com HCl 0,0025 M. Adiciona-se, em seguida, 1 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6 a todos os tubos. A reação é iniciada pela adição de 1 ml de solução de azo-caseína a 1,5%, preparada em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6 e aquecimento a 100°C por 15 minutos. A temperatura é mantida a 37°C e o tempo de reação é de 20 minutos. Após este tempo a reação é detida pela adição de 1 ml de ácido tricloroacético a 10%. Depois de 30 minutos de repouso as suspensões são filtradas em papel qualitativo (Frama, 9 cm. de diâmetro). Aliquotas de 1 ml dos fil

trados são tomadas e alcalinizadas com 1 ml de NaOH 2N. Em seguida a absorvância a 440 nm é lida em um espectrofotômetro, utilizando-se células de 1 cm de espessura. Provas em branco das concentrações extremas de tripsina são sempre feitas paralelamente. Correções para as concentrações intermediárias são obtidas por interpolação. Devido ao fato de que a reação com azo-caseína (e caseína) não segue uma cinética de ordem zero, os gráficos de velocidade contra concentração de enzima são, caracteristicamente uma curva, o que dificulta bastante a reprodutibilidade dos ensaios (39). Com a finalidade de contornar esta dificuldade adotamos o artifício proposto originalmente por Miller e Johnson e que consiste em grafar não os valores de absorvância e sim estes valores elevados a 3/2, isto é, $A^{1,5}$ (39, 41).

Uma unidade de atividade trípptica é definida como o aumento de 1,0 unidade de absorvância ($A^{1,5}$) em 440 nm por 20 minutos nas condições de ensaio aqui descritas.

Protocolo da atividade trípptica (pg. 34).

2b.3. Atividade anti-trípptica

A atividade anti-trípptica é proporcional à diferença entre as atividades ($A^{1,5}$, ver acima) de uma amostra contendo tripsina e de amostra(s) contendo tripsina e inibidor, a enzima estando em concentração igual a da amostra sem inibidor.

A tripsina utilizada deve produzir uma $A^{1,5}/20$ minutos, nas condições do ensaio, em torno de 0,150 o que, para as nossas preparações significa cerca de 6 a 8 μg da enzima. Deve-se sempre usar uma solução de inibidor que reduza no máximo à metade o valor desta absorvância.

Todo o procedimento é semelhante ao usado para a determinação da atividade trípptica. Uma unidade de atividade anti-trípptica (UI) é definida, neste caso, como o número de unidades de tripsina inibidas. É sempre aconselhável empregar, para

PROTOCOLO PARA A ATIVIDADE TRÍPTICA
(AZO-CASEÍNA)

Tubo	Tripsina, ml	HCl 0,0025M, ml	TF 0,1M,pH ml 7,6,	Azo-caseína ml 1,5%,	TCA 10%, ml	Azo-caseína ml 1,5%
1	0,1	0,9	1,0	1,0	1,0	-
2	0,2	0,8	1,0	1,0	1,0	-
3	0,3	0,7	1,0	1,0	1,0	-
4	0,4	0,6	1,0	1,0	1,0	-
5	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0	-
6	0,6	0,4	1,0	1,0	1,0	-
7	0,7	0,3	1,0	1,0	1,0	-
8	0,8	0,2	1,0	1,0	1,0	-
9	0,9	0,1	1,0	1,0	1,0	-
10	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0	-
B1	0,1	0,9	1,0	-	1,0	1,0
B10	1,0	0,0	1,0	-	1,0	1,0

Banho a 37°C por 5 minutos

Banho a 37°C por 20 minutos

Tratamento idêntico a partir desta etapa (Ver texto).

OBS.: A adição de azo-caseína deve ser regularmente espaçada (por exemplo: a cada 15 segundos).

os cálculos, uma curva com pelo menos 3 pontos. Com isto pode-se detectar inibidores com baixas constantes de associação e avaliar com melhor precisão o potencial (em UI) de uma determinada preparação. Também, neste caso, a atividade anti-tríptica não depende da pureza da amostra de tripsina usada. A unidade de inibidor corresponde a cerca de 6-7 μg de inibidores de tripsina de Vigna (PM de 10.000).

A Fig. 4 mostra a inibição de tripsina por um extrato de semente de carolina (Adenantha pavonina), empregando azo-caseína como substrato.

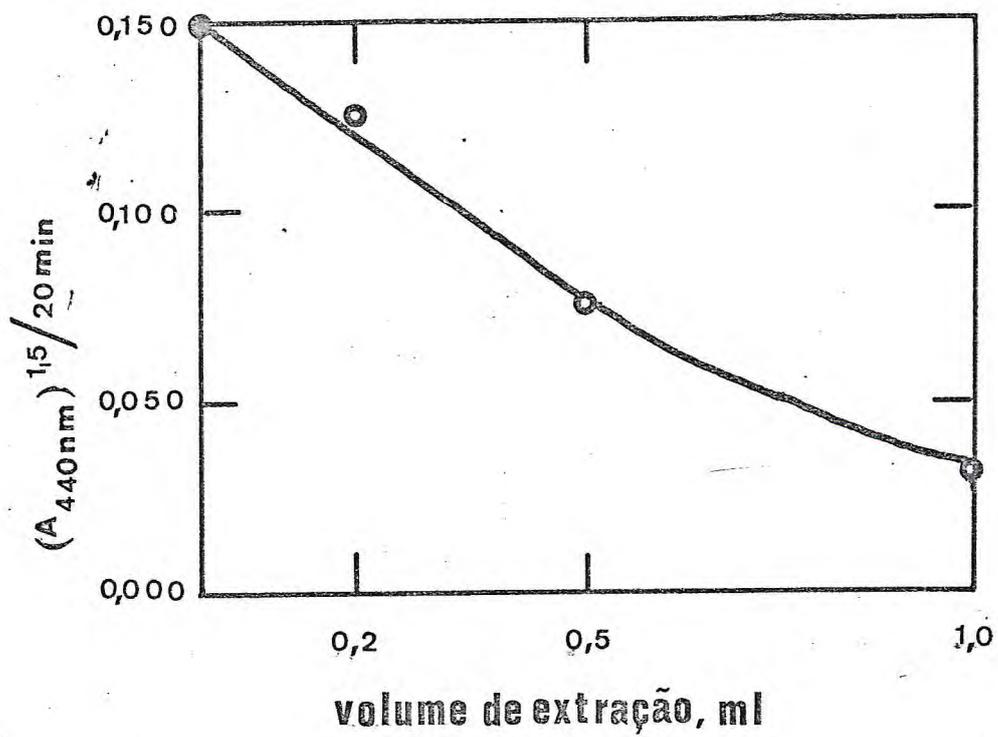
Protocolo da atividade anti-tríptica (pg. 31)

2c. Ensaio tendo BAPA como substrato

Neste ensaio a atividade da tripsina é medida pela hidrólise de α -benzoi-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPA), substrato sintético desenvolvido por Erlanger et al. (32). O produto corado, p-nitroanilina, tem um coeficiente de extinção de 8.800 em 410 nm o que permite usar concentrações do substrato da ordem de 1 milimolar.

2c.1. Atividade tríptica

Uma solução estoque de tripsina contendo de 0,400 a 0,500 mg/ml é preparada como foi descrito anteriormente para o ensaio caseinolítico de Kunitz (ver atrás). Volumes crescentes da solução de tripsina, de 0,05 a 0,5 ml, são pipetados para tubos de ensaio e os volumes completados para 0,5 ml com HCl 0,0025 M. Tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6 (0,5 ml) é adicionado aos tubos para perfazer um total de 1 ml. Os tubos são levados a um banho a 37°C onde são deixados por 5 minutos quando a reação é iniciada pela adição de 2 ml de solução de BAPA $1,25 \times 10^{-3}$ M. Esta solução é preparada dissolvendo-se inicialmente o substrato em cerca de 5% do volume final em dimetilsul



PROTOCOLO PARA A ATIVIDADE ANTI-TRÍPTICA
(AZO-CASEÍNA)

Tubo	Inibidor, ml	TF	0,1M,pH ml 7,6,	tripsina, ml	Azo-caseína ml 1,5%	TCA ml 10%	Azo-caseína ml 1,5%
1	0,2		1,3	0,5	1,0	1,0	-
2	0,5		1,0	0,5	1,0	1,0	-
3	1,0		0,5	0,5	1,0	1,0	-
B1	0,2		1,3	0,5	-	1,0	1,0
B3	1,0		0,5	0,5	-	1,0	1,0
T	0,0		1,5	0,5	1,0	1,0	-
BT	0,0		1,5	0,5	-	1,0	1,0

Banho a 37°C por 10 minutos
 Banho a 37°C por 20 minutos

Tratamento idêntico a partir
 a partir desta etapa.
 (Ver texto).

OBS.: A adição de azo-caseína deve ser regularmente espaçada (a cada 15 segundos).

foxido (DMS) e o volume completado com tampão fosfato. Após exatamente 10 minutos a reação é parada pela adição de 0,5 ml de ácido acético 30%. Uma prova em branco sem a enzima sempre é preparada e submetida ao mesmo tratamento. A absorbância das soluções a 410 nm é lida utilizando-se um espectrofotômetro, em células de 1 cm de espessura.

A velocidade da reação (UDO/10 minutos ou nanomoles de substrato hidrolisado/mililitro.10 minutos) é proporcional à quantidade de tripsina até um valor de cerca de 12 µg de enzima ativa (ver adiante). Uma unidade de atividade trípica é definida como aquela quantidade de enzima que produz um equivalente de 28,4 nanomoles de p-nitroanilina por mililitro por 10 minutos (valor baseado no volume final). Este equivalente de p-nitroanilina corresponde a um valor de 0,250 UDO/10 minutos.

Protocolo da atividade trípica (pg. 33).

2c.2. Atividade anti-trípica

A atividade anti-trípica, do mesmo modo como no ensaio caseinolítico e azo-caseinolítico, é proporcional à diferença entre a atividade trípica (UDO/10 minutos ou nanomoles de substrato hidrolisado/ml.10 minutos) de uma amostra contendo tripsina e a atividade de amostra(s) contendo inibidor e tripsina, estando esta na mesma concentração. Utiliza-se como padrão uma quantidade de enzima que produza no ensaio um valor de UDO/10 minutos igual a 0,500, equivalente a 56,8 nanomoles de p-nitroanilina produzidos/ml.10 minutos (cálculo baseado no volume final). Esta quantidade de tripsina corresponde acerca de 40 a 50 µg das nossas preparações (ver atrás). A solução de inibidor, preparada em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6, deve ser de tal ordem que cerca de 0,25 ml da mesma reduzam para 0,250 UDO/10 minutos ou 28,4 nanomoles de p-nitroanilina produzidos/ml.10 minutos a atividade da tripsina padrão. Uma unidade de atividade anti-trípica é definida como a quantidade de inibidor que nas condições do ensaio reduz a atividade da trip

PROTOCOLO PARA A ATIVIDADE TRÍPTICA
(BAPA)

Tubo	Tripsina, ml	HCl 0,0025M, ml	TF 0,1M, pH7,6, ml	BAPA ($1,25 \times 10^{-3}$ M, ml)	AcOH 30%, ml
1	0,05	0,45	0,50	2	0,50
2	0,10	0,40	0,50	2	0,50
3	0,30	0,20	0,50	2	0,50
4	0,40	0,10	0,50	2	0,50
5	0,50	0,00	0,50	2	0,50
B	-	0,50	0,50	2	0,50

OBS.: A adição de BAPA a cada tubo deve ser regularmente espaçada (por exemplo: a cada 15 segundos).

sina de 0,500 UDO/10 minutos para 0,250 UDO/10 minutos. As mesmas correções para desvios da absorbância de 0,500, tida como padrão, e a mesma fórmula derivada anteriormente para experiências onde somente um ponto é obtido, são válidas para o ensaio utilizando-se BAPA como substrato.

A unidade de inibidor, agora definida, é independente da pureza da tripsina e corresponde a cerca de 2,1 μg de inibidor de Vigna unguiculata (PM de 10.000 dältons).

Protocolo da atividade anti-triptica (pg. 35).

PROTOCOLO PARA A ATIVIDADE ANTI-TRÍPTICA
(BAPA)

Tubo	Inibidor, ml	TF	0,1M, pH7,6, ml	Tripsina, ml	BAPA ($1,25 \times 10^{-3}$ M, ml)	AcOH 30% ml
1	0,1		0,8	0,1	2	0,5
2	0,2		0,7	0,1	2	0,5
3	0,3		0,6	0,1	2	0,5
4	0,4		0,5	0,1	2	0,5
5	0,5		0,4	0,1	2	0,5
6	-		0,9	0,1	2	0,5
B	-		1,0	-	2	0,5

OBS.: A adição de BAPA a cada tubo deve ser regularmente espaçada (por exemplo: a cada 15 segundos).

3. MÉTODOS QUALITATIVOS

Bem cedo no desenvolvimento destas investigações sobre inibidores em plantas, tornou-se evidente a necessidade de métodos de análise que fossem potencialmente capazes de indicar possíveis modificações dos inibidores, ocorridas durante os processos de preparação. Perdas consideráveis durante a purificação do inibidor de tripsina/quimiotripsina (IT/IQ) de Vigna unguiculata cv. seridô apontaram para a possibilidade de alteração da estrutura primária dessa proteína (42). Esta possibilidade foi bastante reforçada pelas investigações de Chu e associados (43) que mostraram haver modificações na estrutura primária de inibidores quando submetidos a tratamento com ácido tricloroacético, base dos métodos universalmente empregados para isolamento de inibidores de tripsina (44).

Em 1968 Uriel e Berges (33) desenvolveram um método de coramento negativo semi-quantitativo de detecção de inibidores de tripsina e quimiotripsina após eletroforese zonal em placas de acrilamida-agarose. O método se baseia na ação de tripsina ou quimiotripsina sobre um substrato, acetil-DL-fenilalanina- β -naftil ester (APNE), cujo produto de hidrólise, β -naftol pode ser tornado visível por reação com um sal de diazônio. Desta maneira, após eletroforese, a placa de gel contendo inibidores de tripsina é mergulhada em uma solução de enzima e após certo tempo o excesso é retirado por lavagens em água. A placa é então mergulhada em uma mistura de APNE e orto-dianisidina tetrazotizada, nos locais onde há inibidor a reação de hidrólise não se processa, não havendo conseqüentemente formação do produto de cor rosa. Os inibidores são portanto visualizados como zonas incolores em um fundo rosa intenso (33). A visualização no caso de placas, se torna mais intensa se a placa é dessecada sobre papel de filtro tipo W-3MM, sob vácuo e a alta temperatura (ca. de 70 - 80°C).

Este método de coramento negativo, em conjunção com os métodos eletroforéticos descritos aqui, têm sido de impor-

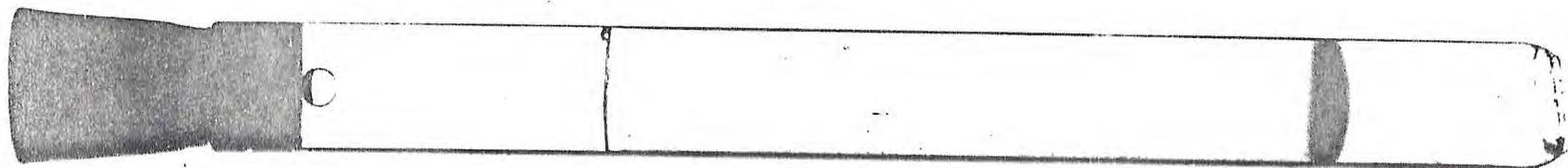
tância significativa no controle de alterações porventura ocasionadas pelos métodos preparativos normalmente usados por nós.

3a. Eletroforese em gel de poliacríamida a pH 8.1

O método de Clarke (45), empregando um sistema contínuo para eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8.1 foi inicialmente empregado nestas investigações como base de um critério de pureza quando do isolamento dos dois inibidores de maior significação quantitativa do cultivar seridõ de Vigna unguiculata. O inibidor de tripsina/quimiotripsina de pI 4,7 foi isolado por métodos convencionais alcançando-se uma purificação da ordem de 225 vezes (42). A Fig. 5 é a fotografia de um gel representativo desta purificação; as condições de eletroforese foram as normais recomendadas por Clarke e proteína foi corada com negro de amido. O isolamento do inibidor de tripsina, de pI 5,0, mostra as limitações desse método. Neste sistema associante (35) não foi possível mostrar homogeneidade com o sistema simplès de Clarke (Fig. 6,A). Experiência anterior (46), quando substituímos parte da água na formulação do gel de Clarke por uréia 8 M mantendo o mesmo pH 8,1 proporcionou o resultado esperado; o inibidor de tripsina é um sistema associante nas condições de eletroforese normal; na presença de uréia 8 M, no entanto, este sistema é desfeito e o inibidor se apresenta como uma entidade homogênea (Fig. 6,B).

Após a introdução em nosso laboratório do método de coramento negativo para inibidores de tripsina e quimiotripsina proposto por Uriel e Berges (33), o sistema de Clarke se mostrou de uma utilidade muito grande sô ultrapassada pelo sistema de eletrofocalização em placas de gel de poliacrilamida, utilizada por nós como proposto por Awdeh et al. (47).

Assim é que, utilizando o método de Clarke em combinação com o método de Uriel e Berges conseguimos mostrar a presença de pelo menos quatro grupos distintos de inibidores de tripsina em estratos brutos de três cultivares de Vigna unguiculata; um desses grupos, o de maior mobilidade/acidez também



(-)



C

(+)



B



A

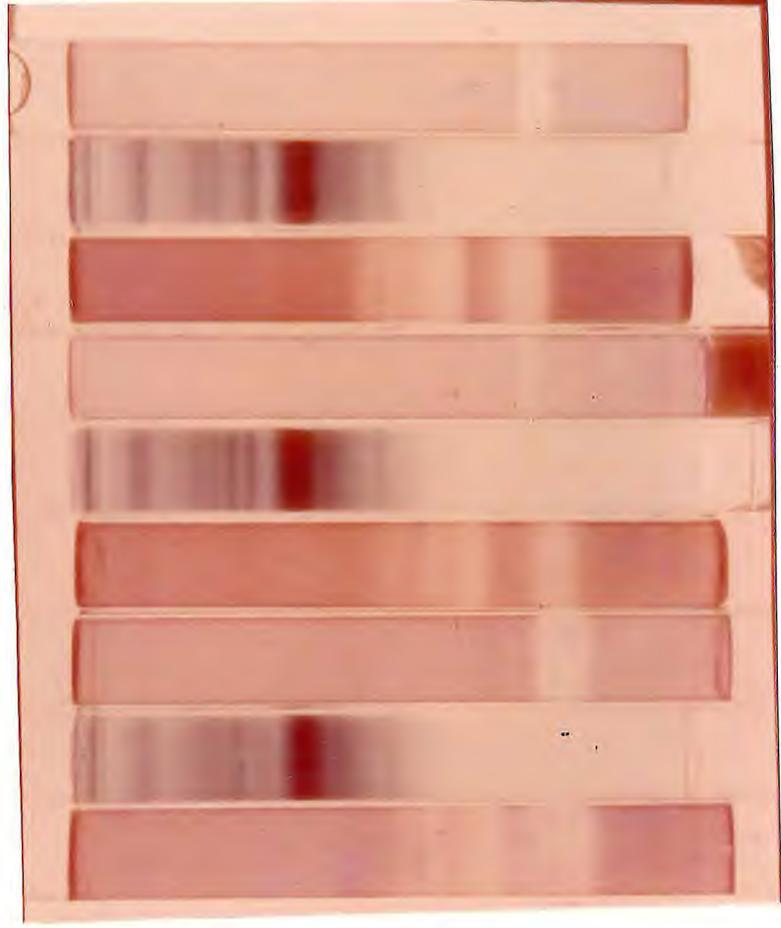
representa o(s) inibidor(es) de quimiotripsina. A Fig. 7 mostra uma experiência típica utilizando tripsina, quimiotripsina e negro de amido como corantes. Volumes idênticos, das mesmas soluções foram aplicadas em cada caso; isso dá uma idéia da alta sensibilidade do método de coramento negativo, quando se observa que não há bandas coradas para proteínas na região dos inibidores.

Os inibidores de tripsina e quimiotripsina em cilindros de gel a pH 8,1 M são detectados de acordo com as técnicas de Uriel e Berges (33) e Kaiser e Belitz (34). Após eletroforese os inibidores são tratados a 37°C por 30 minutos com uma solução de tripsina (0,1 mg/ml) ou quimiotripsina (0,05 mg/ml) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Após incubação os cilindros são lavados com água destilada (6 vezes) e reincubados a 37°C, 30 minutos. São tratados então por uma mistura de APNE (2,5 mg/ml) em dimetilformamida com o-dianisidina tetrazotizada em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 (0,55 mg/ml) na proporção de 1:9. Após 30 minutos os cilindros são lavados com ácido acético 7%. Os inibidores são visualizados como bandas incolores sobre um fundo rosa.

3b. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS.

Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS para avaliação de pesos moleculares é feita essencialmente de acordo com o método de Weber e Osborn (48). A técnica de coramento negativo proposta por Uriel e Berges (33) também neste caso foi fundamental no estabelecimento de um método que, em nosso laboratório, é a base da determinação de pesos moleculares de inibidores de tripsina e quimiotripsina, quer em extratos brutos de material vegetal quer em preparações purificadas de inibidores das duas proteínas acima referidas (36).

O método se baseia no fato de que tripsina (e quimiotripsina) são ativas em presença de SDS (49). Desse modo, eletroforese de inibidores de tripsina ou quimiotripsina em solu-



a1 a2 a3 b1 b2 b3 c1 c2 c3

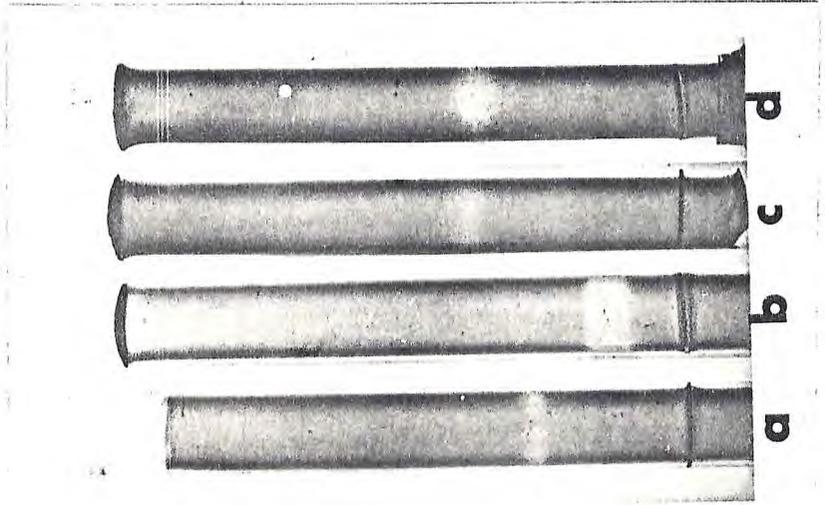
ções contendo SDS 1% é feita normalmente segundo o método de Weber e Osborn (48). Após eletroforese os cilindros de gel são lavados com água destilada e postos em contato, sob agitação contínua por 24 horas, com uma solução cuja composição é 75 ml de ácido acético, 50 ml de metanol e 875 ml de água. Este tratamento tem a dupla finalidade de eliminar parte do detergente ao mesmo tempo que fixa as proteínas à matriz de gel. Os inibidores de tripsina e quimiotripsina são tornados visíveis seguindo um tratamento idêntico aquele já descrito anteriormente para a técnica de eletroforese pH 8,1. A única diferença é que as concentrações de enzimas usadas são duas vezes maiores.

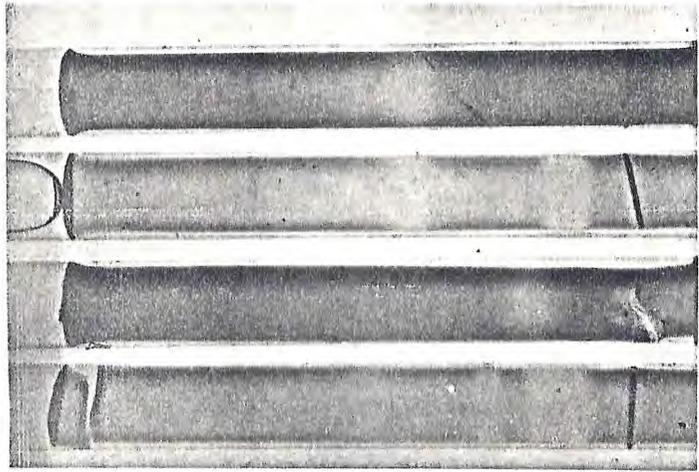
Este método nos permite a distinção dos inibidores de Vigna unguiculata em dois grupos distintos de acordo com sua massa molecular. O primeiro grupo, de baixo peso molecular, em torno de 10.000 dältons, é representado por inibidores de tripsina enquanto que o segundo grupo de peso molecular em torno de 24.000 dältons é representado pelo inibidor de tripsina/quimiotripsina (Figs. 8, 9) (36). Este inibidor apesar de ter um peso molecular em torno de 10.000 apresenta-se em soluções de SDS a 1% como sistema associante como peso molecular aparente de 24.000.

Conseguimos mostrar com auxílio desse método que sementes de soja apresentam também dois grupos de inibidores (36). Um grupo, representado pelo inibidor de Kunitz com peso molecular aparente de 17.500, inibe somente tripsina. O outro grupo, formado por inibidores de tripsina e quimiotripsina, com peso molecular em torno de 11.000 dältons, contém certamente o inibidor de Bowman-Birk (10), um inibidor de dupla-cabeça de tripsina e quimiotripsina (Fig. 9). É interessante notar o comportamento diverso dos inibidores de dupla-cabeça de Vigna e de soja, reflexo sem dúvida de diferenças em sua estrutura.

3c. Focalização isoelétrica em placas de gel de poliacrilamida

O método de focalização isoelétrica em gradientes na





a b c d

turais de pH foi introduzido há quase 20 anos por Svensson (50) e se mostrou como uma das técnicas mais poderosas no estabelecimento do grau de pureza de proteínas. O método clássico, como proposto, se baseia no estabelecimento de um gradiente de pH formado por uma mistura de ácidos poliamino policarboxílicos cujos p_Hs cobrem um determinado intervalo os chamados anfólitos; este gradiente é estabelecido após aplicação de corrente elétrica a uma coluna contendo uma mistura dos anfólitos distribuída em um gradiente preformado de sacarose; este gradiente tem como uma das finalidades estabilizar o gradiente de pH que se forma após aplicação da corrente. A proteína ou mistura de proteínas a ser analisada é introduzida no sistema e se distribui de acordo com seus pontos isoelétricos.

Este método, descrito acima em linhas gerais, é bastante dispendioso pois requer quantidades relativamente grandes de anfólitos cujos preços e dificuldades de aquisição são grandes; além disso, a necessidade de voltagens relativamente altas, tempos longos necessários ao estabelecimento do gradiente e necessidade de refrigeração eficiente para dissipar a grande quantidade de calor desenvolvida, levaram ao desenvolvimento de métodos mais simples. Isto foi plenamente alcançado com os métodos de eletrofocalização em gel de poliacrilamida e desses, os métodos que utilizam placas de gel são os mais populares atualmente (51).

O método por nós utilizado tem sido o de Awdeh et al. (47), que é extremamente simples, não exigindo mais que material facilmente encontrado em qualquer laboratório além de naturalmente uma fonte de corrente contínua capaz de fornecer uma diferença de potencial de até 100 volts.

1. Preparação da placa de gel - duas placas de vidro medindo 12 cm X 9 cm, de preferência, escrupulosamente limpas com solução sulfocromica e mantidas em álcool 96^o, após secas, são montadas uma sobre a outra tendo duas ligas de borracha de ca. de 1mm de espessura a separá-las; as extremidades das pla

cas são mantidas juntas por outras duas ligas de borracha. Uma mistura de acrilamida (acrilamida monômero 30% + metileno-bis-acrilamida 1%), água, anfólito (40%) e persulfato de amônio (10mg/ml) (30: 80: 3: 7:) é cuidadosamente distribuída entre duas placas evitando-se a formação de bolhas de ar. Esta mistura fornece um gel com 7,5% de acrilamida, porosidade suficiente para os experimentos de eletrofocalização.

2. Soluções contendo inibidores de tripsina e (quimiotripsina) são aplicadas diretamente sobre a superfície do gel (máximo de 25 μ l) ou embebidas em pequenos pedaços de papel de filtro. O gel é então colocado sobre eletrodos de grafite (recomendável grafites HB) montados em uma caixa plástica, bem fechada e mantida úmida durante todo o experimento. As amostras devem ser aplicadas, de preferência do lado do cátodo.

3. A experiência deve ser iniciada com uma voltagem baixa, cerca de 50 V, e paulatinamente aumentada até 100 V ao longo de 2-3 horas quando a corrente deve estar estabilizada em valores em torno de 1mA ou menos.

4. Após focalização a placa é banhada em uma solução de tripsina (ou quimiotripsina) contendo 0,1mg/ml (ou 0,05mg/ml) de enzima em tampão fosfato 0,2M, pH 7,4; após 30 minutos a solução de enzima é retirada e a placa de gel após ser lavada com água destilada é imersa na mistura contendo o substrato N-acetil-DL-fenilalanina- β -naftil ester como já descrito anteriormente.

5. Após 30 minutos o excesso de substrato é retirado, a placa lavada com ácido acético 7% e imersa por 30 minutos em uma solução de ácido acético 7% contendo glicerol 1%. A placa é então seca sobre papel de filtro Whatmann 3MM sob vácuo, a uma temperatura de 70-80°C em um secador especial.

6. Antes do início do tratamento com tripsina uma tira lateral da placa de gel pode ser retirada e seccionada em pedaços iguais; estas seções são eluidas em água por 24 ho-

ras após o que, mede-se o pH de cada uma das soluções a fim de se construir o gradiente de pH a partir do qual se avaliam os pontos isoelétricos dos inibidores.

A Fig. 10 é representativa da utilização deste método. A multiplicidade de inibidores de tripsina em sementes, como é o caso de Vigna unguiculata mostrada aqui, onde cerca de 10 espécies podem ser distinguidas, é provavelmente indicação de papéis distintos que elas possam exercer no metabolismo vegetal.

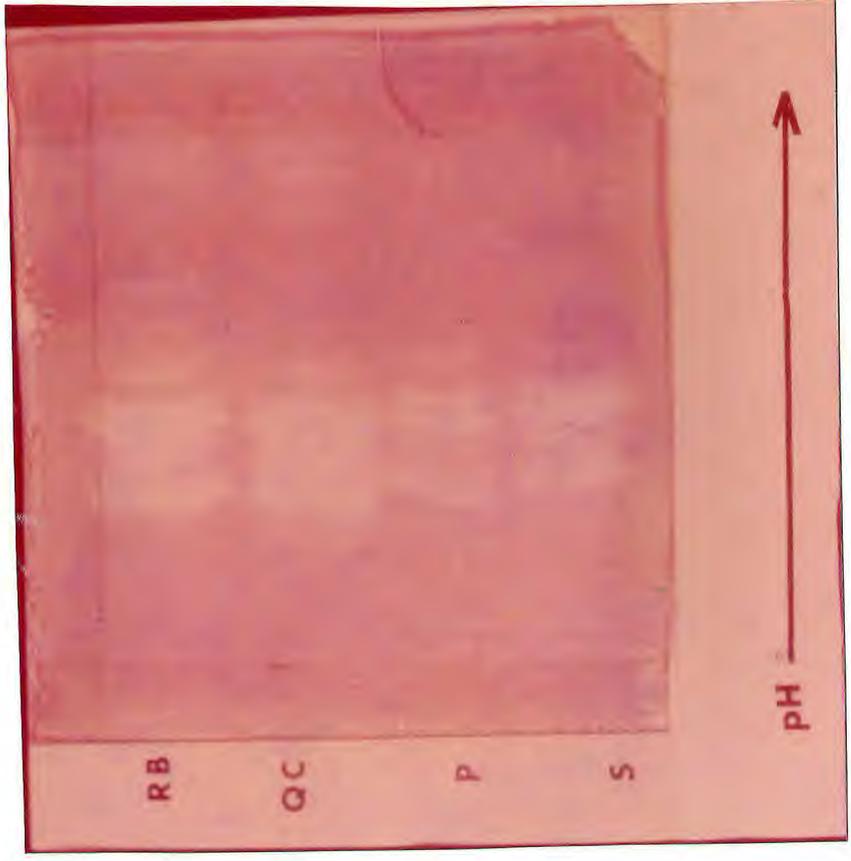
Apesar de qualitativo, foi possível com o método avaliar a quantidade mínima de inibidor necessária a produzir um teste positivo nas condições por nós utilizadas; esta quantidade é da ordem 0,2 μ g ou 0,3 UI_{cas}.

3d. Separação em duas dimensões

O sistema de inibidores de tripsina de Vigna unguiculata examinado tanto por eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,1 (Fig. 7) como por eletroforese em presença de SDS (Fig. 8) e por focalização isoelétrica em placas de gel de poliacrilamida (Fig. 10) e visualizado pelo método de coramento negativo mostrou ser de grande complexidade no que diz respeito a seus pontos isoelétricos e as suas características de associação. Ficou evidente que um método no qual se pudesse explorar estas duas propriedades aumentando as possibilidades de cada uma individualmente, traria um grande avanço na compreensão desse e de outros sistemas.

Com esse intuito foi que tentamos desenvolver um método bidimensional de separação de inibidores empregando eletroforese em gel de poliacríamida em presença de SDS na primeira dimensão e focalização em placas de gel de poliacrilamida na segunda dimensão.

Consultas à literatura sugeriram que esta combinação não surtiria os efeitos esperados pois os complexos proteína-SDS, extremamente estáveis, não seriam facilmente desfeitos(52).

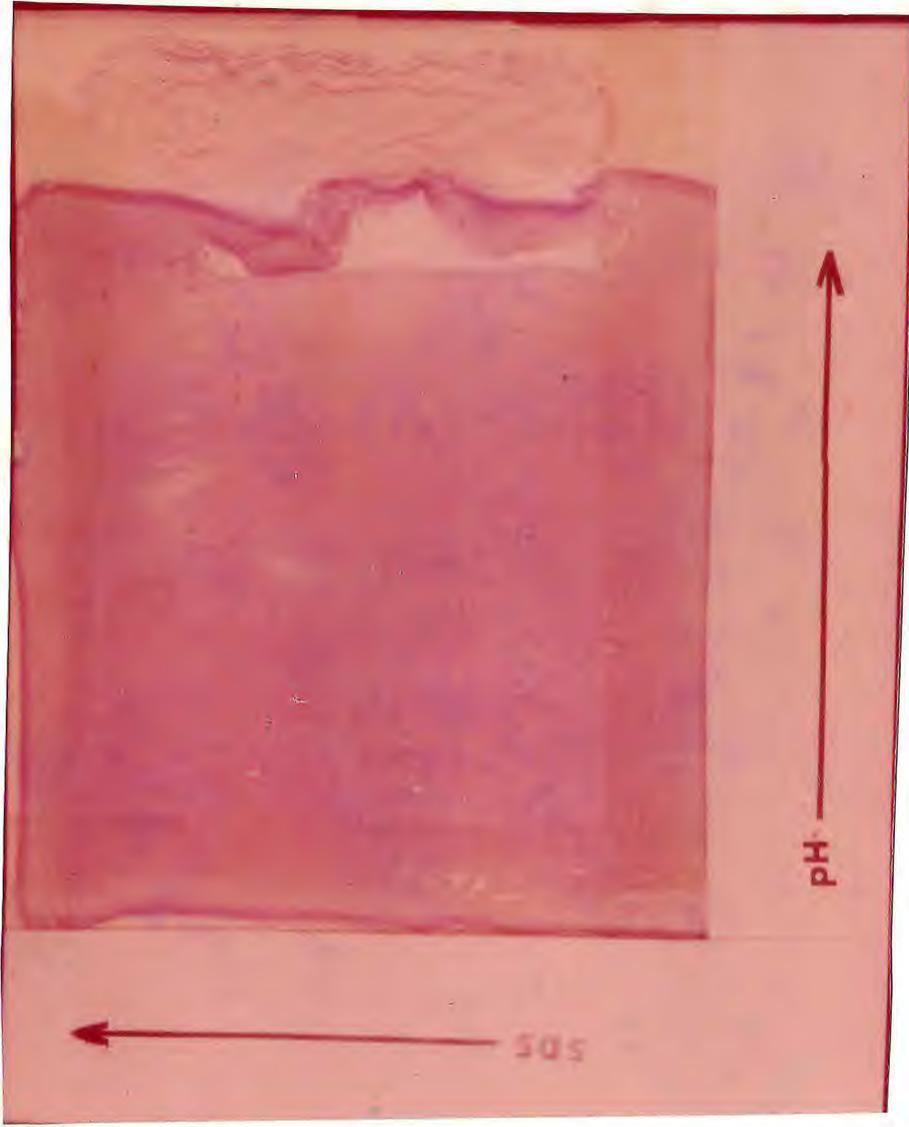


Os resultados preliminares obtidos são, no entanto, bastante promissores. Mesmo com o equipamento rudimentar para focalização isoeletrica já descrito anteriormente, conseguimos separações bidimensionais de inibidores de tripsina que levam a acreditar que o desenvolvimento deste método seja perfeitamente possível para o caso dessas substâncias.

O método desenvolvido consiste na superposição de uma secção de cerca de 1mm de espessura de um cilindro de gel contendo inibidores após eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS, sobre uma placa de gel de poliacrilamida contendo anfólitos preparada como já descrito anteriormente; à esta placa algumas vezes foi incorporada Uréia 8M com a finalidade de facilitar a quebra dos complexos proteína-SDS. Os resultados promissores foram aqueles em que a secção do cilindro de gel foi posta em um corte de igual área feito na placa de gel de poliacrilamida. Resultados também promissores foram obtidos quando as secções foram colocadas entre as duas placas de vidro antes da polimerização do gel de poliacrilamida contendo anfólitos (ver acima). A Fig. 11 mostra o resultado típico obtido sugerindo um esforço maior no aperfeiçoamento da técnica.

4. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO

A maior parte dos métodos clássicos de preparação de inibidores de proteases, principalmente de inibidores de tripsina e quimiotripsina se baseia na eliminação inicial das proteínas contaminantes, de alto peso molecular, por meio de ácidos. O mais empregado desses ácidos, o ácido tricloroacético, um precipitante normal de proteínas solubiliza, a uma concentração de 2,5% a maior parte dos inibidores de tripsina de plantas. Desse modo uma purificação apreciável é conseguida nas primeiras etapas do processo (42). Também de emprego bastante difundido na preparação de inibidores é a utilização de sulfato de amônio na precipitação diferencial da mistura de



proteínas obtida após solubilização por TCA. Os inibidores se comportam geralmente como albuminas, isto é, precipitam entre 40% e 60% de saturação com sulfato de amônio. O material resultante, já bastante enriquecido em inibidores, é submetido a fracionamento posterior utilizando-se, geralmente, métodos cromatográficos. Alguns desses métodos foram utilizados nas investigações descritas neste trabalho. Dentre eles podemos salientar os métodos de cromatografia em trocadores de íons e os métodos de afinidade.

4a. Cromatografia em trocadores de íons

Trocadores de íons são materiais insolúveis formados por uma matriz orgânica ou inorgânica, de origem natural ou sintética e que contêm grupos carregados fixos e contra íons móveis. Os trocadores podem ser aniônicos ou catiônicos de acordo com sua afinidade por anions ou cátions. Uma propriedade fundamental dos trocadores de íons é a presença dos substituintes iônicos que podem ser de diversos tipos.

A cromatografia em trocadores de íons distingue um componente de outro em uma mistura, de acordo com o número de cargas de sinal adequado acessíveis em cada componente para interação com o trocador sob as condições do experimento (53).

Nas investigações de que trata este trabalho foram usados essencialmente dois trocadores de íons, DEAE - Celulose (Dietilaminoetil celulose), um trocador de anions e SP-Sephadex (Sulfopropil-Sephadex), um trocador de cátions.

4a.1. DEAE celulose

Cromatografia em DEAE celulose foi usada pelo autor pela primeira vez em investigações com inibidores para o isolamento e purificação do inibidor IT/IQ de Vigna unguiculata cv. seridõ (42). A cromatografia inicial foi feita utilizando-se uma coluna de 2.0 x 27cm do trocador de anions equilibrado com

tampão fosfato de potássio 0,005M, pH 7,0. Nestas condições e aplicando 500mg de uma preparação rica em inibidores, o chamado Inibidor Bruto (IB, com ca. de 60% de inibidor de tripsina), toda a atividade inibitória quer contra tripsina quer contra quimiotripsina fica retida na coluna. Um gradiente linear de NaCl de 0-1,5M (200ml + 200ml) no mesmo tampão elui as proteínas ativas contra as duas enzimas acima (Fig. 12). Nesta etapa foi conseguida uma purificação de 185 vezes para o inibidor de dupla cabeça (42). Recromatografia utilizando essencialmente o mesmo esquema levou a uma purificação maior de IT/IQ (ca. de 225 vezes). Este inibidor se mostrou essencialmente puro pelos critérios adotados.

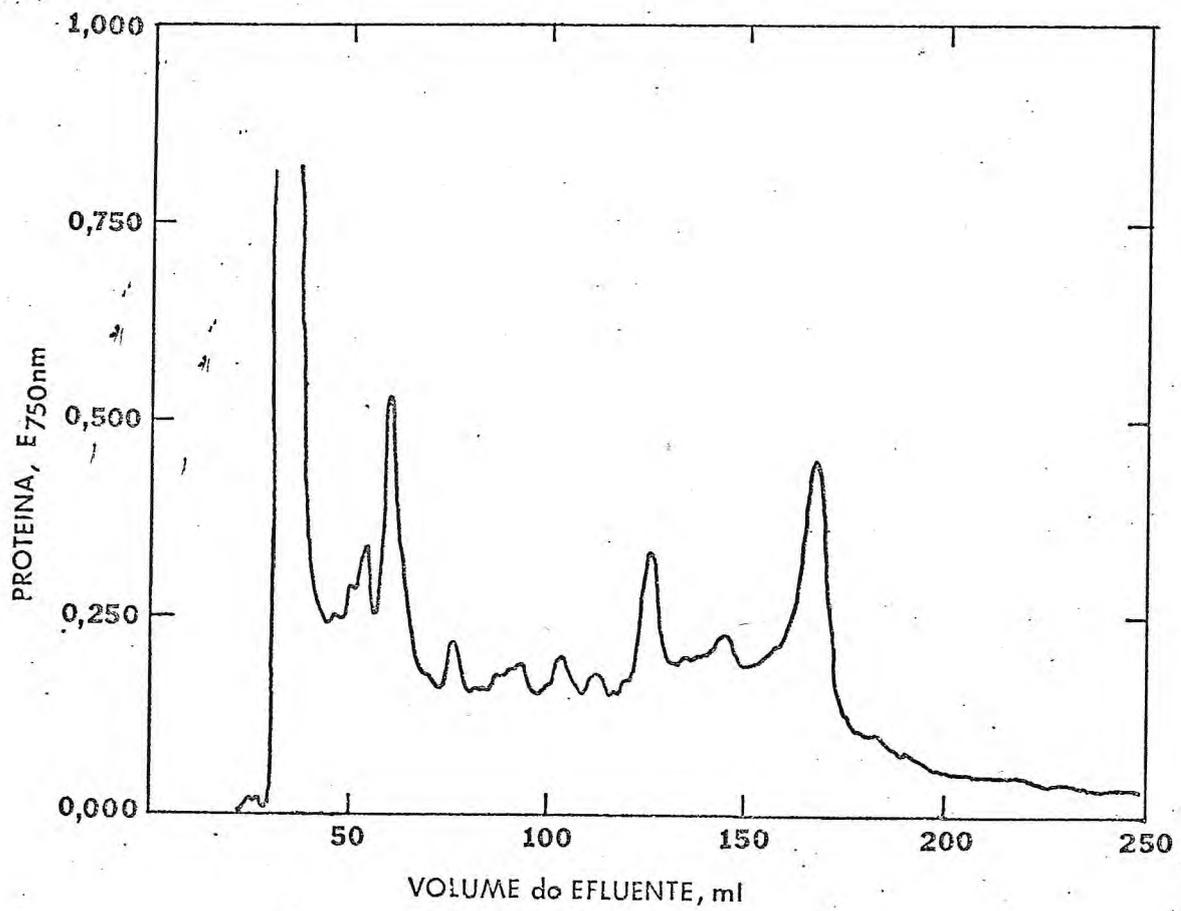
As potencialidades do método cromatográfico utilizado se tornaram evidentes quando o sistema de eluição acima foi alterado. Modificando-se somente o gradiente, ao invés de um gradiente linear foi utilizado um gradiente exponencial de NaCl com concentração limite de 0,6 M (frasco misturador de 1000 ml), a grande complexidade do sistema em estudo (V. unguiculata) foi vista pela primeira vez (Fig. 13). Esta complexidade, com relação aos inibidores de tripsina viria a ser confirmada depois por eletrofocalização em placas de gel de poliacrilamida (35).

4ã.2. SP-Sephadex C-25

Os trocadores de íons tendo gel de poliacrilamida (Bio-Gel) ou gel de dextrana (Sephadex) como matriz tem uma maior densidade de grupos ionizáveis do que os trocadores com matriz de celulose, por exemplo. Por outro lado, as propriedades de filtração molecular características desses materiais são mantidas nos trocadores de íons. Desse modo o seu emprego permitir separações de espécies de acordo com a carga média e com o tamanho molecular.

SP-Sephadex C-25 é um trocador de cátions com 2,3 meq/g de capacidade (2 a 4 vezes maior que a capacidade de

Fig. 12. Cromatografia do Inibidor Bruto de Vigna unguiculata cv. seridõ em DEAE-celulosa. Coluna equilibrada com fosfato 0,005 M de pH 7,0. Eluição feita com o mesmo tampão e, a partir de 150ml com um gradiente linear de NaCl (0 - 1,5 M). Absorbância (--●--) a 750 nm (reagente de Folin); atividade anti-triptica (---o---) e antiquimiotriptica (—●—) medidas pelo método caseinolótico de Kunitz.



CM - celulose um trocador de cátions com matriz celulósica) total e aconselhado pelo fabricante para separações de moléculas de PM menores que 30.000 e maiores que 200.000 (54).

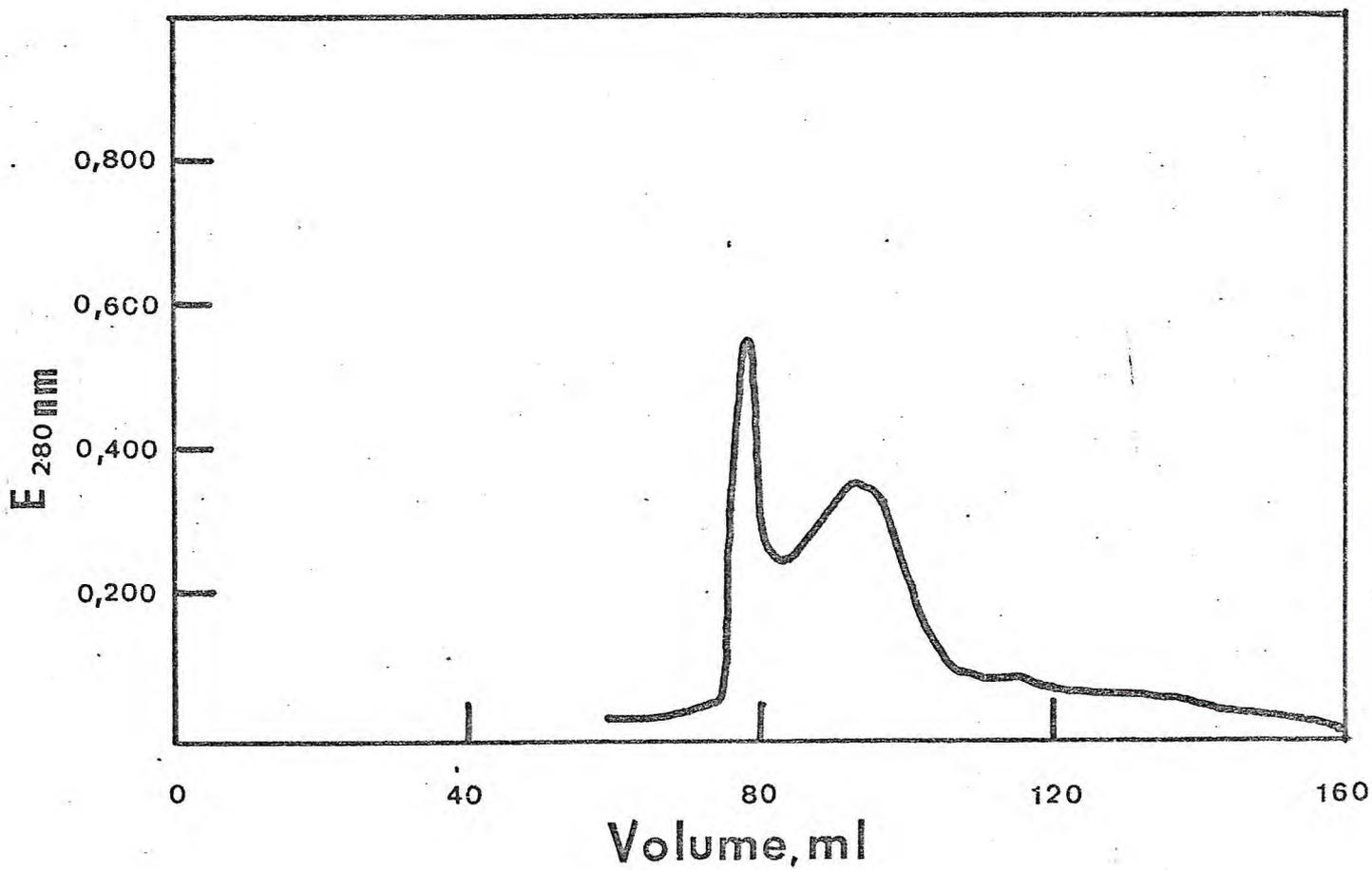
O inibidor IT/IQ isolado por cromatografia em DEAE-celulose foi cromatografado em SP - Sephadex C25 utilizando-se uma coluna de 1,3 X 18 cm. A coluna foi equilibrada com tampão acetato de sódio 0,01M, de pH 4,0. Cerca de 12 mg do inibidor acima, dissolvidos e dializados contra o tampão de equilíbrio foram aplicados na coluna e a eluição processada com um gradiente exponencial de NaCl com concentração limite de 0,5M e utilizando-se uma câmara de mistura de 100 ml. A Fig. 14 mostra o resultado obtido. Focalização isoeletrica em placas de gel de poliacrilamida mostra que a fração F I na figura é o inibidor IT/IQ de pI = 4,0, isolado anteriormente (42). As outras frações são inibidores que contaminam em maior ou menor escala as preparações obtidas por cromatografia em DEAE-celulose.

4b. Métodos de afinidade

Os métodos cromatográficos de separação por afinidade se baseiam na interação da substância que se quer separar com outra substância (o ligante) presa a um suporte sólido (a matriz). Esta separação pode ser baseada em uma propriedade biológica ou uma característica química (55).

Entre as matrizes mais usadas estão aquelas baseadas em agarose, um polissacarídeo linear formado por unidades alternantes de D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose (56). Nas nossas investigações sempre utilizamos Sepharose-4B um gel de agarose fornecido por Pharmacia Fine Chemicals AB, considerado altamente favorável para esta finalidade devido as suas propriedades de exclusão molecular (20×10^6 daltons), estabilidade térmica e uma capacidade de absorção não específica extremamente baixa (55).

Com relação aos ligantes utilizados para isolamento de inibidores temos feito uso de tripsina, quimiotripsina e re



centemente, anidro-tripsina.

4b.1. Sepharose-4B-tripsina

Sepharose-4B-tripsina foi preparada pelo acoplamento de tripsina bovina a Sepharose-4B ativada por brometo de cianogênio, de acordo com o método de Kassel e Marcinişzyn utilizando-se um tampão borato de pH 9,0 (57).

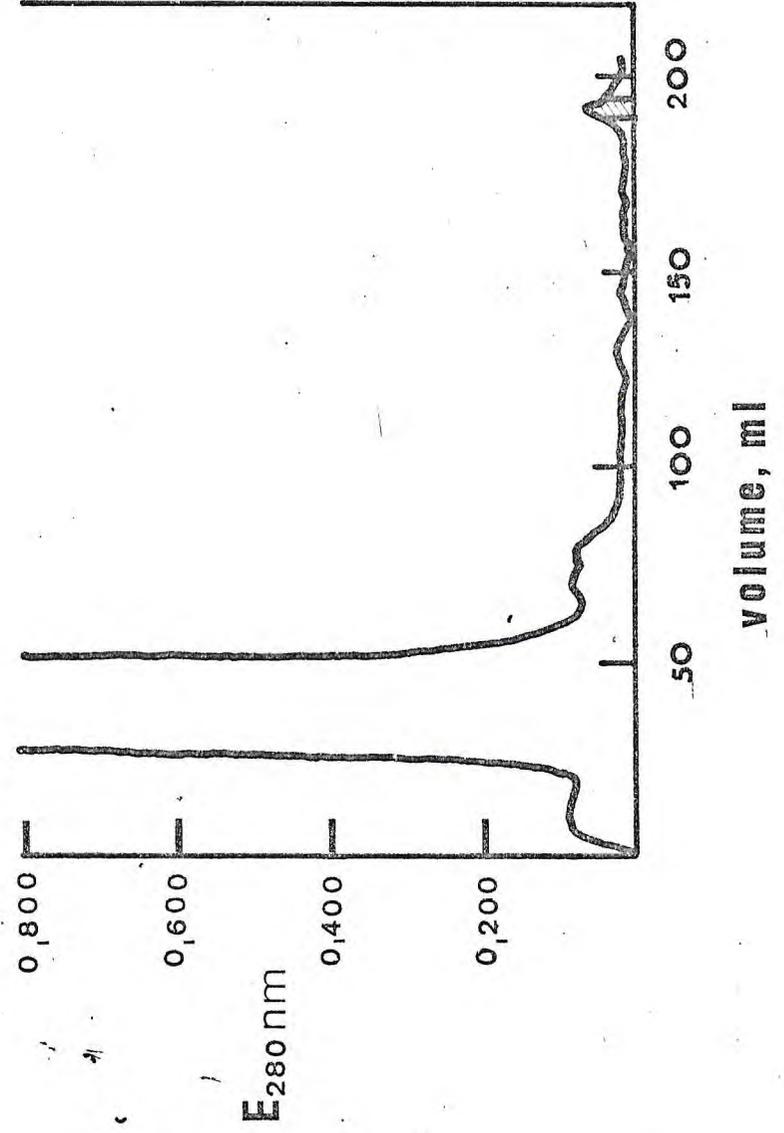
Uma coluna com este absorvente, medindo 1,3 X 17 cm foi montada e utilizada para preparar inibidores de farinha de amêndoa de caju (Anacardium occidentale). O esquema de eluição utilizado foi uma adaptação daqueles sugeridos por Feinstein (58) e Cechova(59), fazendo-se a adsorção a pH 8,0 (trietanolamina 0,1M, CaCl₂ 0,01M). A Fig. 15 mostra uma experiência típica onde se obteve uma purificação de mais de 6.000 vezes. A Fig. 16 mostra eletroforese do material recuperado indicando ainda uma pequena contaminação de menor mobilidade que o(s) inibidor(es).

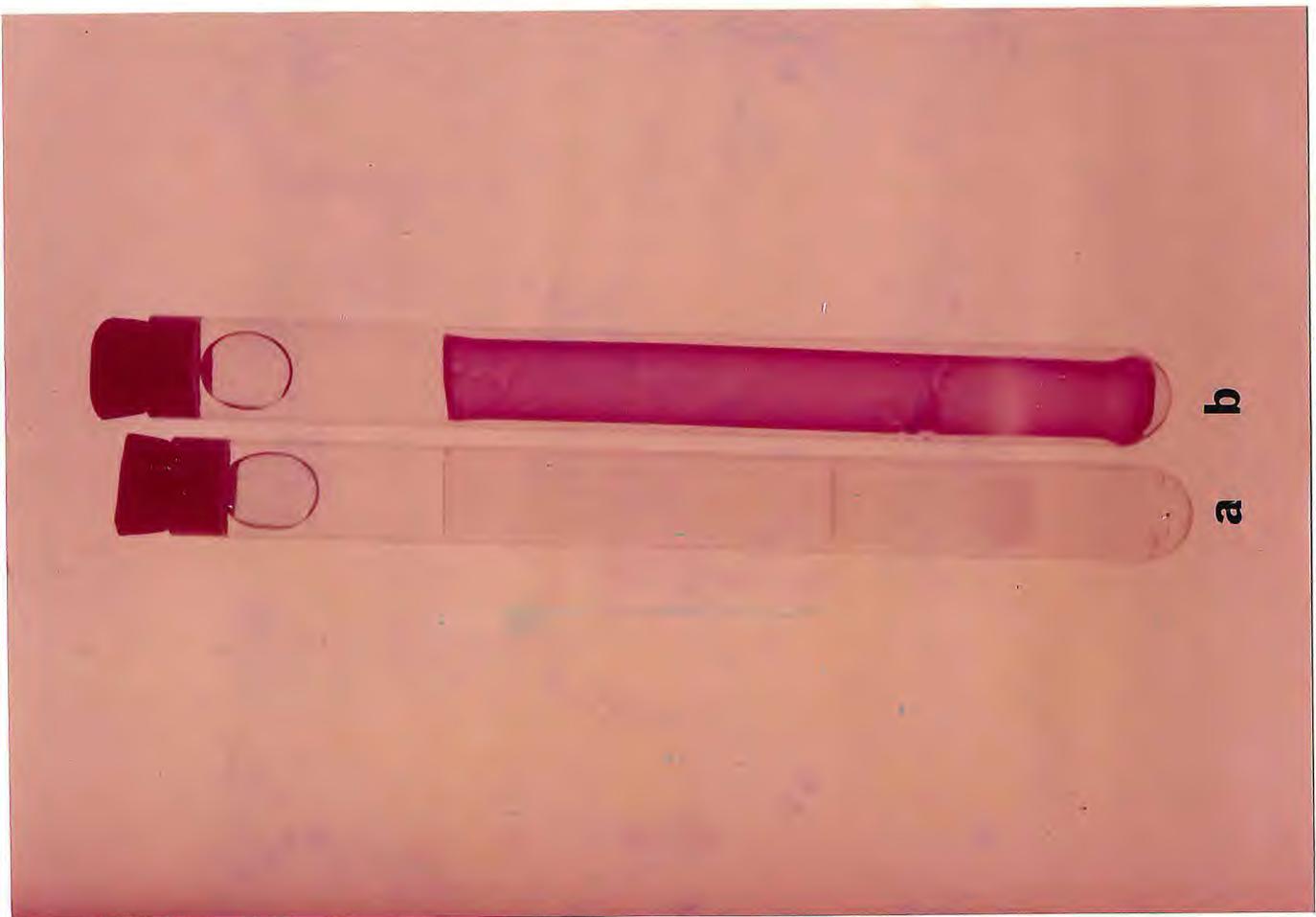
4b.2. Sepharose-4B-quimiotripsina

Em investigações sobre a identidade entre os inibidores de dupla cabeça IT/IQ de três cultivares de Vigna unguiculata, utilizamos na purificação destas substâncias uma coluna de Sepharose-4B-quimiotripsina preparada de modo idêntico ao empregado na preparação de Sepharose-4B-tripsina (57). O esquema de eluição empregado foi o de Cechova (59). A Fig. 17 mostra uma experiência típica com material do cultivar seridô. Nesta etapa foi obtida uma purificação dos inibidores de quimiotripsina de cerca de 1.270 vezes.

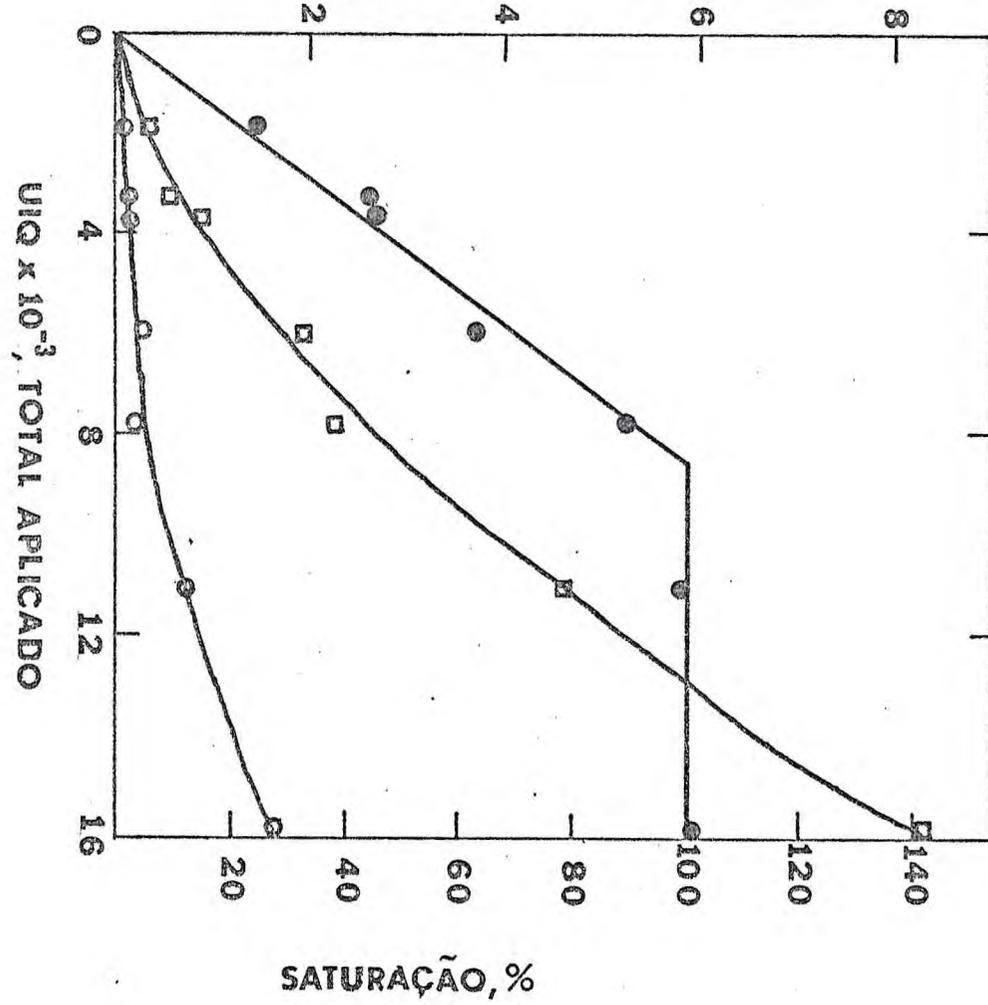
É interessante notar a ocorrência de perdas na atividade anti-quimiotriptica dos extratos durante passagem na coluna; estas perdas chegaram a atingir 35% da quantidade de inibidor aplicada havendo também uma pequena percentagem (ca. de 5%) de inibidor não retido (Fig. 18). As perdas são provavelmente devidas a uma ação hidrolítica da enzima sobre o inibi-

TEA AcNa NaCl HCl
pH 9 pH 4 pH 2





UIQ $\times 10^{-3}$, RETIDAS (\bullet), NÃO RE-
TIDAS (\circ), PERDIDAS (\square)



dor de quimiotripsina, ação que também se faz sentir sobre o inibidor retido (60).

4b.3. Sepharose-4B-anidro tripsina

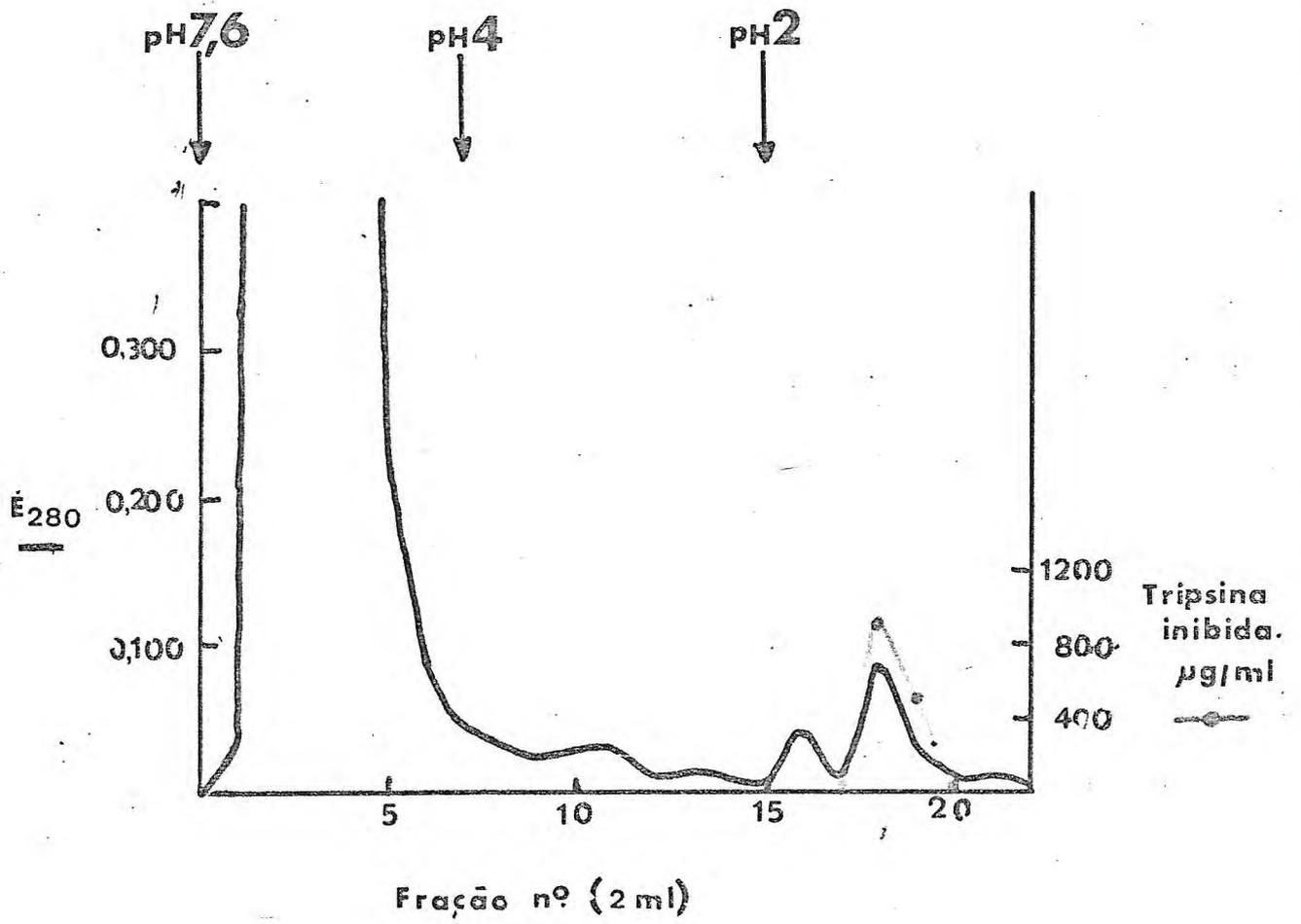
O emprego de tripsina ou quimiotripsina ativas presas a um suporte sólido para o isolamento de inibidores tanto de origem animal como de plantas data do meado da década de 60 com os trabalhos dos grupos de Fritz, Werle e Hochstrasser na Alemanha. Logo foi constatado que os inibidores separados não eram homogêneos e na maioria das vezes a heterogeneidade foi mostrada ser proveniente de clivagem enzimática dos inibidores pelas enzimas, clivagem esta normalmente feita no sítio ativo (61). Este fenômeno, em muitos casos foi explorado com vantagem pois permitiu o estudo do sítio ativo de muitos inibidores. Para outros estudos no entanto, a necessidade de se isolar os inibidores no estado nativo é essencial e é óbvio que o método não é exatamente adequado para isso. Foster e Ryan (62) e Feinstein e Feeney (63) mostraram pela mesma época que tripsina e quimiotripsina cataliticamente inativas eram capazes de complexar seus inibidores. Este fato traz como corolário que a interação entre enzima inativa e inibidor não causa o aparecimento de novas formas de inibidor.

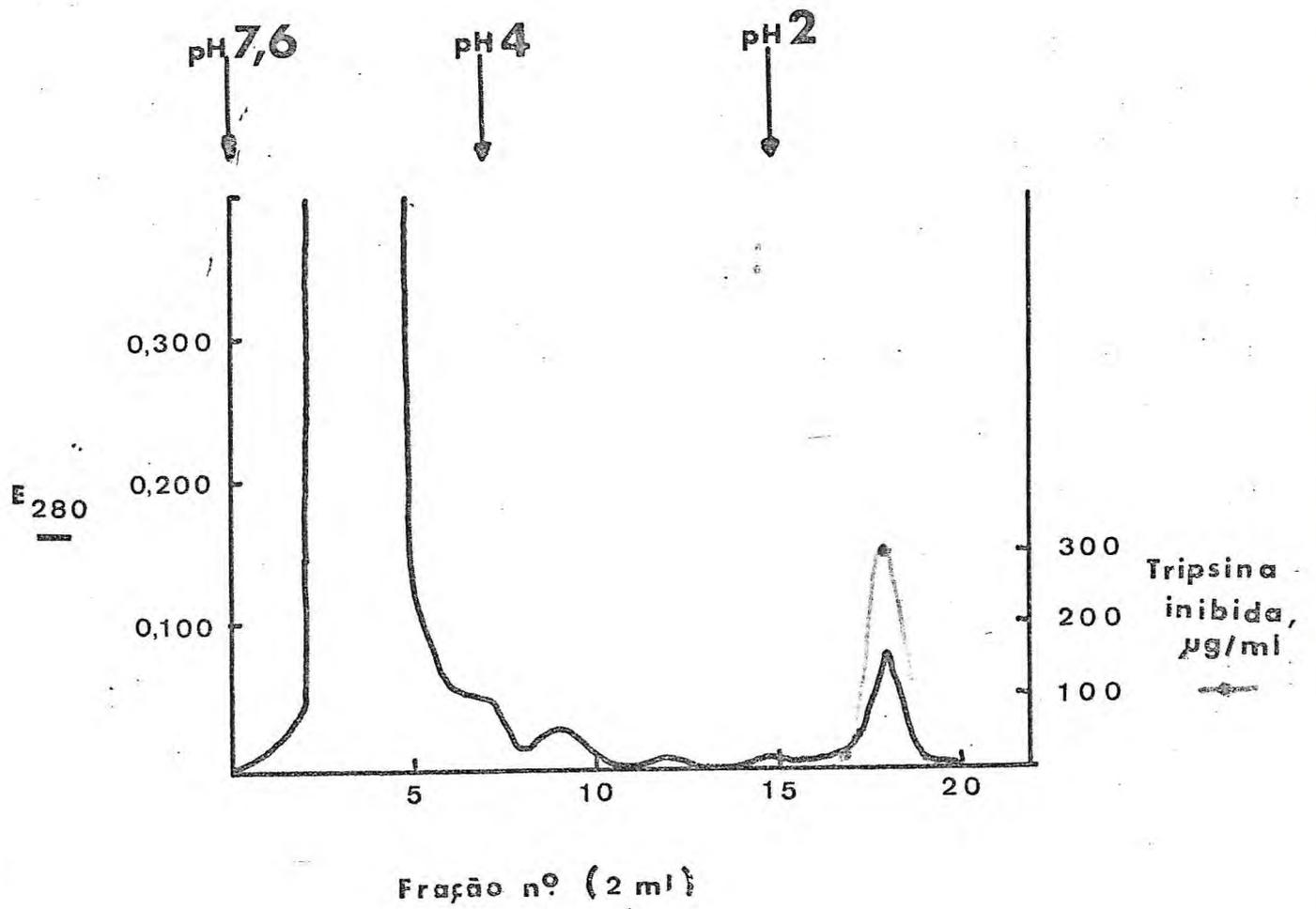
Tripsina inativa, ou mais precisamente anidrotripsina, foi pela primeira vez empregada como ligante em cromatografia de afinidade por Feinstein em 1974 para verificar a possibilidade de clivagem de um inibidor de pâncreas humano quando isolado por Sepharose-tripsina (64). Ele demonstrou que a conversão de um inibidor em outro de menor acidez não era devida a ação de tripsina ativa mas ocorria espontaneamente a pH baixo.

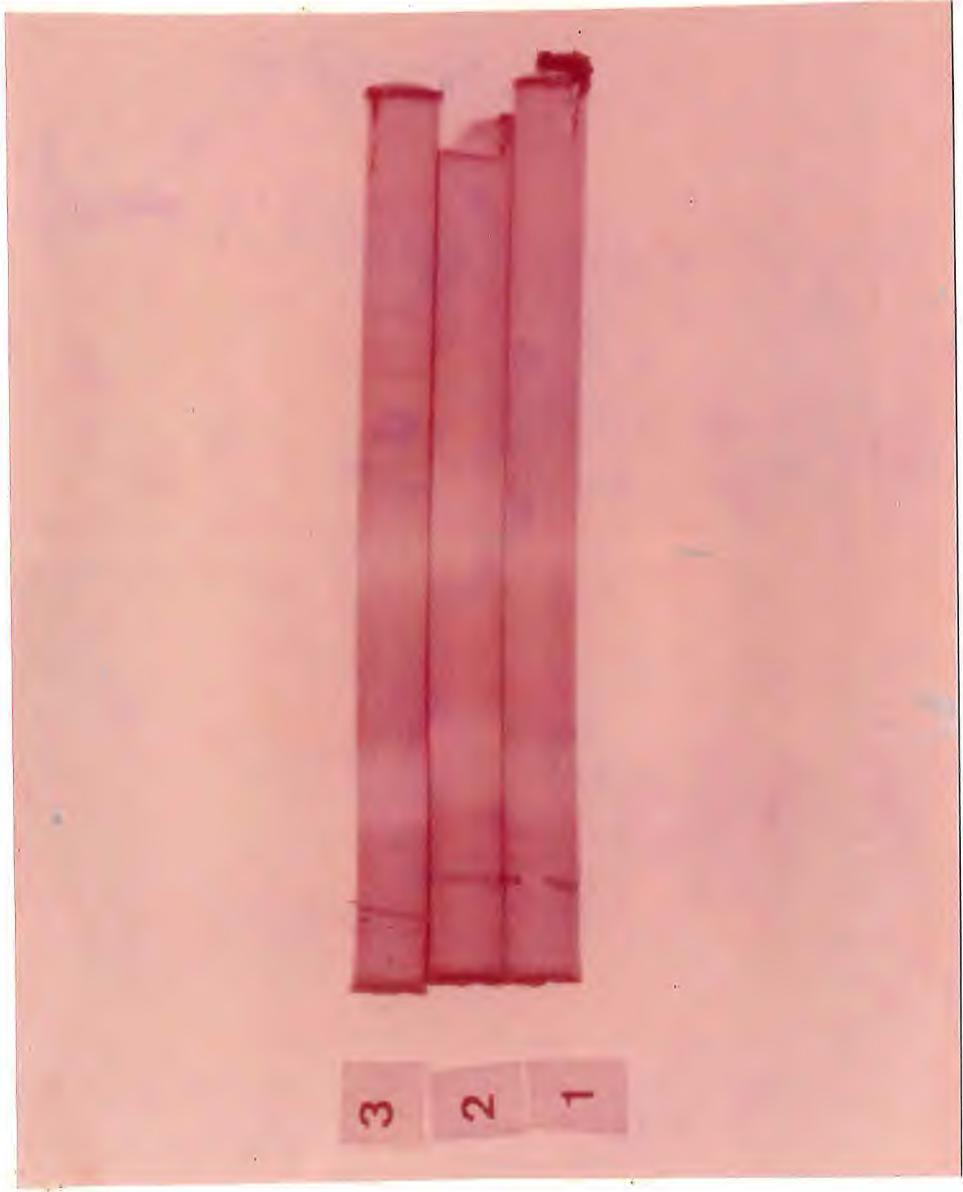
Anidro-tripsina foi pela primeira vez empregada como método preparativo por Bogard e Laskowski (65) e pelo autor (66) tendo em mente exatamente explorar a vantagem do método em não contribuir para o aumento da complexidade do sistema de inibidores de tripsina, no caso de Bogard e Laskowski em pâncreas

de peru e no nosso caso, em sementes de Vigna e Canavalia.

Anidro-tripsina foi preparada pelo método de Ako et al. (67) a partir de PMS-tripsina esta obtida segundo Fahrney e Gould (68). A preparação final, uma mistura de anidro-tripsina, tripsina ativa e proteína desnaturada foi tratada por TLCK (p-tolueno sulfonil clorometilcetona) um inibidor específico para tripsina (69). A preparação final continha cerca de 1% de tripsina cataliticamente ativa e 47% de espécies (AN-T e TLCK-T) capazes de complexar o inibidor de soja (63). Esta preparação foi ligada a Sepharose-4B ativada por brometo de cianogênio, pelo método de Kassel e Marciniszyn (57). Uma coluna de 1,3 X 5 cm foi montada e utilizada para separação dos inibidores de tripsina de Vigna unguiculata cv. seridô. Foi utilizada uma preparação semi-purificada de inibidores tendo sido verificada a total retenção dos mesmos e eluição em condições semelhantes aquelas utilizadas para eluição dos inibidores em colunas de Sepharose-tripsina, (Figs. 19 e 20). Obtivemos uma recuperação praticamente total da quantidade de inibidores aplicada em ambos os casos. Comparação dos inibidores isolados por Sepharose-AN-T e Sepharose-T utilizando-se focalização isoelétrica em placas e eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (Fig. 21) sugere que prováveis modificações na estrutura primária dos inibidores causada pela ação da tripsina ativa não são detectadas por esses métodos (70).







3 2 1

PARTE III - INIBIDORES DE TRIPSINA EM SEMENTES

1. INTRODUÇÃO

A presença de inibidores de tripsina em plantas foi pela primeira vez constatada em sementes de soja, uma leguminosa de grande importância nutricional (2). Esta talvez seja a razão pela qual a maior parte das sementes nas quais se detectou a presença de inibidores pertença a esta família. Mesmo dentro da família das leguminosas parece ter havido uma preferência dirigida dos estudos para a sub-família Papilionoideae. Provavelmente isto teria sido devido ao fato de que nesta sub-família esteja classificada a maior parte das sementes de legumes que servem de alimento ao homem ou animais domésticos (71).

Outras famílias que englobam espécies cujas sementes ou outros órgãos de reserva têm importância nutricional, como a das gramíneas e solanáceas, foram cedo também examinadas com relação a presença de inibidores (17).

Sendo assim, inibidores de tripsina em espécies destas três famílias botânicas foram preferencialmente estudados desde que se iniciaram os estudos sobre estas substâncias.

Ultimamente, entretanto, tem havido um interesse acentuado na investigação de inibidores de proteases, principalmente de tripsina em outras famílias ou mesmo nas sub-famílias Caesalpinioideae e Mimosoideae. Este interesse resulta, sem dúvida, das tentativas de compreensão do significado da presença dessas substâncias em plantas, isto é, da função que elas exercem no metabolismo vegetal (17).

Desse modo a expansão das fronteiras filogenéticas em que se encontram presentes os inibidores mostraria a universalidade de sua presença que seria decorrência da importância de sua função ou funções.

Segundo Strasburger, pode-se reconhecer cinco divisões de primeira ordem no Reino Vegetal: esquisófitos, talófi-

briófitos, pteridófitos e espermatófitos (72).

Inibidores de proteases foram encontrados em bactérias, como é o caso de Escherichia coli em que um sistema protease-inibidor tem sido bastante estudado por H. Holzer (73). Recentemente M. Richardson (74), isolou e purificou um inibidor de protease de uma alga-azul (Spirulina maxima). Inibidores em briófitos e pteridófitos no entanto, parecem não ter sido até hoje detectados.

Os quadros I e II mostram a distribuição de inibidores de tripsina em espécies de espermatófitos; é evidente a preferência dos estudos dirigida para espécies de angiospermas e dentre estas ressalta o que já foi dito antes, o maior número de investigações na família das leguminosas (Quadro II).

Não seria temerária a afirmação de que estes inibidores ou substâncias assemelhadas estão presentes em todos os vegetais sendo as sementes ou outros órgãos de reserva provavelmente, os locais de sua maior acumulação.

Vale salientar que a não detecção de inibidores de tripsina em uma espécie pode ser devida a ineficácia do método utilizado; níveis relativamente baixos de inibidores podem não ser detectados pelos métodos comuns, atualmente empregados.

2. ESTUDOS INICIAIS

As nossas investigações sobre inibidores de tripsina em sementes iniciadas em 1965 foram ditadas tanto pelo interesse em estender a um número maior de famílias botânicas as investigações até então realizadas, como pelo interesse em investigar sementes potencialmente úteis como fontes de alimento para o homem e animais domésticos, nativas do nordeste. Assim é que foi possível detectar a presença de inibidores em um número de espécies bastante afastadas das normalmente examinadas - leguminosas, solanáceas e gramíneas - e mesmo sementes de diversas famílias de possível interesse econômico. O Quadro I mostra, por exemplo, que foram encontrados por nós, inibidores

QUADRO I
ESPECIES CUJAS SEMENTES CONTEM INIBIDORES DE TRIPSINA

(Divisões segundo Strasburger (72).

GIMNOSPERMAS

Referências

Classe VI . Coniferas

(1) Araucariaceae

Araucaria angustifolia (pinha)

(75)

ANGIOSPERMAS

Classe I . Dicotiledoneas

Ordem 1. Polycarpicae

(2) Lauraceae

Persea americana (abacate)

(75)

(3) Anonaceae

Anona squamosa (ata)

(75)

Ordem 2. Rosales

(3) Rosaceae

Prunus americana

(76)

Ordem 3. Leguminosae

(Ver Quadro II)

Ordem 4. Mirtales

(8) Trapaceae

Trapa natans

(76)

Combretaceae

Terminalia catapa (castanhola)

(75)

Ordem 5. Readales

(3) Cruciferae

Brassica rapa

(7)

Raphanus sativus (rabanete)

(77)

Ordem 10. Terebintales

() Anacardiaceae

Anacardium occidentale (caju)

(75)

Mangifera indica (manga)

(75)

Ordem 19. Urticales

() Moraceae

Artocarpus integrifolia (jaca) (75, 7)

Artocarpus communis (fruta pão) (75)

Ordem 20. Tricoceae

() Euphorbiaceae

Ricinus communis (mamona) (78a)

Cnidoscullus phyllacanthus (favela) (75)

Ordem 24. Centrospermae

() Chenopodiaceae

Beta vulgaris (7)

Ordem 30. Tubiflorae

() Convolvulaceae

Ipomoea batatas (batata doce) (7)

Ordem 31. Personatae

() Solanaceae

Nicotiana tabacum (fumo) (17)

Solanum tuberosum (batata) (17)

Solanum lycopersicum (tomate) (17)

() Plantaginaceae

Plantago asiatica (76)

Ordem 34. Sinandrae

() Compositae

Lactuca sativa (alface) (7)

Classe II . Monocotiledoneas

Ordem 1. Helobiae

() Alismataceae

Alisma plantago-aquatica (76)

Ordem 5. Glumiflorae

() Gramineae

Triticum vulgare (trigo) (7)

Oryza sativa (arroz) (7)

Hordeum vulgare (cevada) (7)

Fagopyrum esculentum (7)

QUADRO II

ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS, CUJAS SEMENTES CONTÊM INIBIDORES DE TRIPSINA

Ordem 3. de Dicotilodoneas seg Strasburger (72).

Referências

Mimosaceae

<i>Stryphnodendron</i> sp. (barbatimão)	(75)
<i>Adenantha</i> pavonina (carolina)	(75)
<i>Enterolobium</i> contortisiliquum (timbauba)	(75)
<i>Leucaena</i> sp.	(75)
<i>Pithecellobium</i> cauliflorum (canafístula de lag)	(75)
(<i>Pithecellobium</i> dumosum (jurema branca))	(75)
<i>Entada</i> gigas	(78)
<i>Elephantorrhiza</i> burkei	(78)
<i>Dichrostachys</i> cinerea	(78)
<i>Mimosa</i> caesalpinifolia (sabiã)	(75)
<i>Mimosa</i> pigra	(78)
<i>Mimosa</i> polycarpa	(78)
<i>Mimosa</i> pudica	(78)
<i>Acacia</i> ancistocarpa	(78)
<i>Acacia</i> arabica	(78)
<i>Acacia</i> cambagei	(78)
<i>Acacia</i> coriacea	(78)
<i>Acacia</i> murrayana	(78)
<i>Acacia</i> pruinocarpa	(78)
<i>Acacia</i> stipuligera	(78)
<i>Acacia</i> tenuissima	(78)
<i>Acacia</i> torulosa	(78)
<i>Acacia</i> victoriae	(78)
<i>Calliandra</i> surrinamensis	(78)
<i>Albizia</i> lebbeck	(78)
<i>Pithecellobium</i> multiflorum	(78)
<i>Inga</i> laurina	(78)
<i>Inga</i> nobilis	(78)

(Cont. QUADRO II)

Caesalpinioideae

Caesalpinia ferrea (juçá)	(75)
Caesalpinia pyramidalis (catingueira)	(75)
Gleditsia triacanthus	(7)
Gymnocladus dioica	(7)
Cassia alata (manjerioba)	(75)
Cassia tora (matapasto liso)	(75)
Cassia sericea (matapasto cabeludo)	(75)
Hymenaea courbaril (jatobá)	(75)
Tamarindus indicus (tamarindo)	(75)
Bauhinia purpurea	(79)
Bauhinia monandra ("cassia")	(75)
Cercis canadensis	(7)

Papilionoideae

Canavalia maritima	(75)
Canavalia ensiformis (feijão de porco)	(80)
Canavalia brasiliensis (feijão de boi)	(75)
Lablab purpureus	(81)
Arachis hypogaea (amendoim)	(81)
Cajanus indicus	(81)
Cajanus cajan	(7)
Cicer arietinum (grão de bico)	(81)
Glycine max (soja)	(81)
Glycine soja	(8)
Glycine gracilis	(8)
Glycine wightii	(8)
Lathyrus odoratus (ervilha)	(81)
Lathyrus sativus	(8)
Lespedeza stipulacea	(81)
Vigna radiata	(81)
Vigna unguiculata	(81)
Vigna mungo	(81)
Vigna angularis	(82)

<i>Vigna umbellata</i>	(83)
<i>Phaseolus lunatus</i>	(81)
<i>Phaseolus coccineus</i>	(7)
<i>Phaseolus aconitifolius</i>	(84)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	(81)
<i>Stizolobium deeringianum</i>	(81)
<i>Cyamopsis psoraloides</i>	(7)
<i>Cyamopsis tetragonoloba</i>	(8)
<i>Lens esculenta</i> (lentilha)	(7)
<i>Medicago sativa</i> (alfalfa)	(7)
<i>Pisum sativum</i>	(7)
<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	(7)
<i>Mucuna deeringianum</i>	(7)
<i>Sophora japonica</i>	(7)
<i>Trifolium repens</i>	(7)
<i>Vicia faba</i>	(7)
<i>Vicia angustifolia</i>	(85)
<i>Vicia cracca</i>	(86)
<i>Clitoria ternatea</i>	(8)
<i>Abrus precatorius</i>	(75,8)
<i>Dioclea sclerocarpa</i> (mucunã negra)	(75)
<i>Dioclea grandiflora</i> (mucunã lisa)	(75)
<i>Centrosema pubescens</i> (jitirana)	(75)
<i>Platycyamus regnelli</i> (mangalõ)	(75)
<i>Erythrina velutina</i> (mulungu)	(75)
<i>Crotalaria retusa</i> (chocalho de cobra)	(75)
<i>Dolichos diflorus</i>	(84)
<i>Macrotyloma axillare</i>	(87)
<i>Faba vulgaris</i>	(7)

de tripsina em sementes de Araucaria angustifolia (pinha, uma gimnosperma), Persea americana (abacate), Annona squamosa (ata) todas elas espécies filogeneticamente mais primitivas que as leguminosas. Além dessas, outras espécies foram examinadas e invariavelmente conseguimos detectar a presença de inibidores.

Sementes utilizadas como fonte de alimentos como Anacardium occidentale (caju) e outras de utilização potencial tais como Mangifera indica (manga), Artocarpus integrifolia (jaca), Hymenaea courbaril (jatobá), entre muitas, foram examinadas, sugerindo em alguns casos a necessidade de tratamento prévio para que as mesmas possam ser aproveitadas como alimentos, por exemplo, pelo homem ou animais monogástricos.

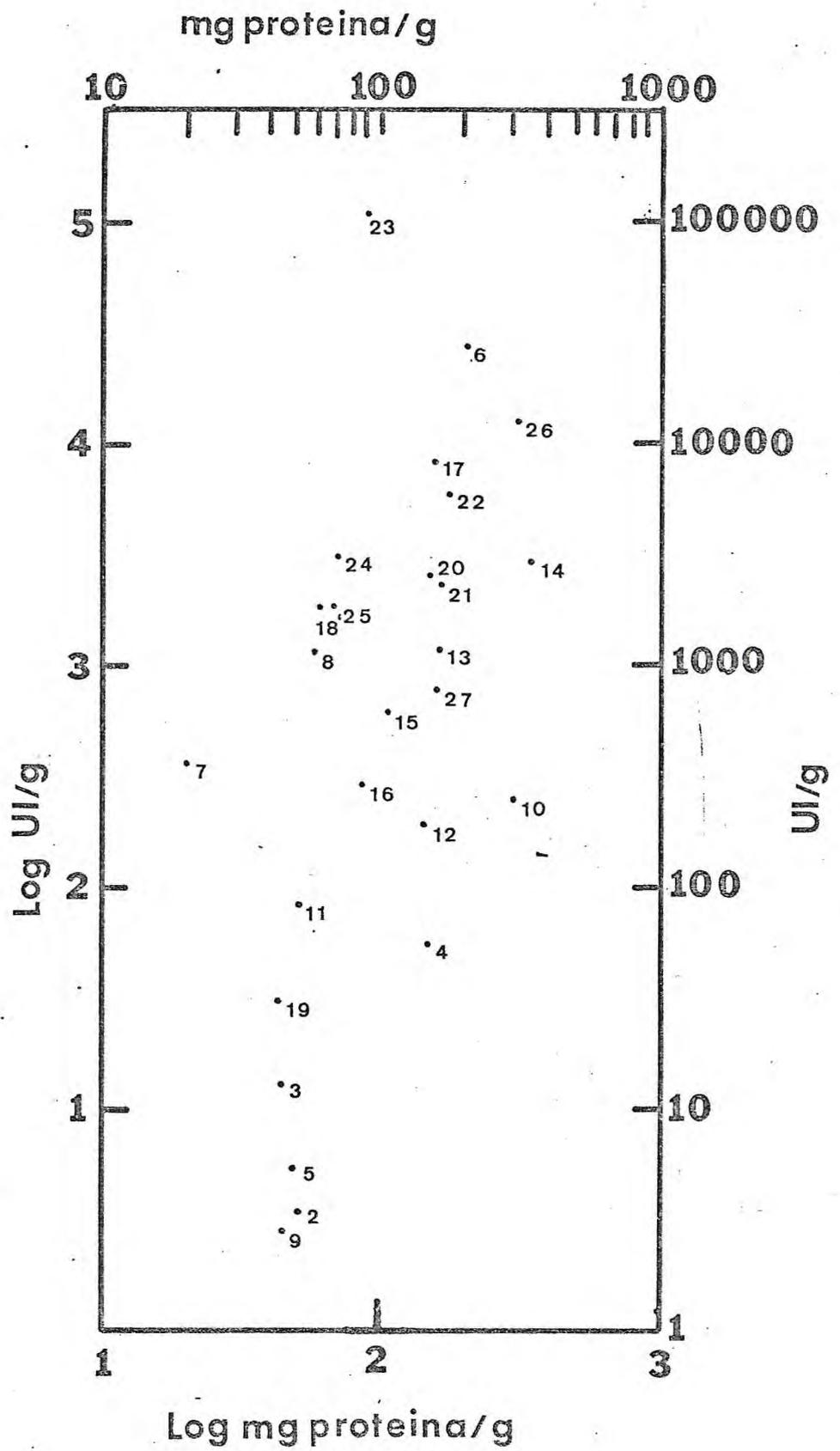
2a. Estudos em leguminosas

O nosso interesse também se voltou para o estudo de espécies de leguminosas e dentre estas de membros da sub-família Mimosoideae. O estudo de sementes desta sub-família se mostrou interessante por dois fatos: o primeiro, de que até o início da década de 70 não havia aparecido nenhum estudo sobre inibidores em sementes de mimosoideas e o segundo, o fato de que a maior parte dos membros da sub-família são árvores e também naquela época não haviam sido detectados inibidores em sementes de espécies arbóreas.

Os resultados destes estudos estão mostrados na Tabela I e nas Figs. 22 e 23. Eles foram obtidos por medida dos inibidores de tripsina pelo método caseinolítico de Kunitz como utilizado em nosso laboratório, em extratos de farinha das sementes, geralmente sem o tegumento. Os extratos eram obtidos por extração com água destilada. Pode-se observar que as espécies de mimosoideas diferem enormemente em suas concentrações de inibidores e que Adenantha pavonina, uma mimosa arbórea tem um dos maiores teores de inibidores de tripsina até hoje encontrados por nós (ver adiante). Outras espécies arbóreas como jatobá e tamarindo (ambas da sub-família Caesalpi-noideae) não são tão ricas em inibidores. A Fig. 22 sugere uma

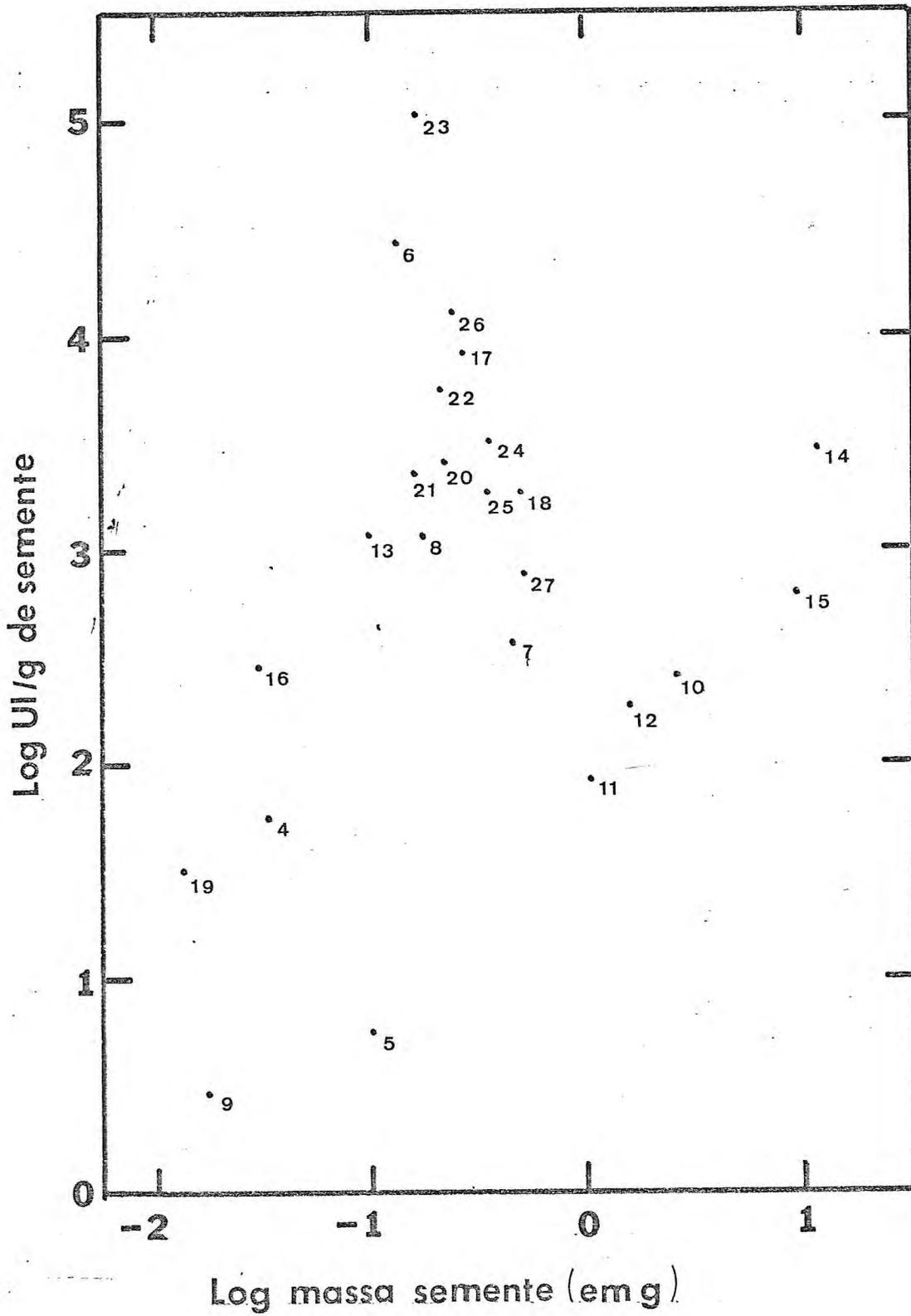
TABELA I - Massa de semente, concentração de proteínas e concentração de inibidores de tripsina em sementes de algumas espécies nativas e cultivadas. O método utilizado nas determinações de atividade antitriptica foi o método de Kunitz e as unidades, aquelas definidas pelo autor. Os extratos foram feitos em água destilada.

SEMENTE	MASSA		PROTEÍNA		INIBIDORES DE TRIPSINA	
	g/sem.	log	mg/g sem.	log	UI/g sem.	log
1. Persea americana (abacate)	81,800	1,91	-	-	0,78	-0,13
2. Anacardium occidentale (caju)	2,800	0,45	51	1,71	3,48	0,54
3. Sorghum bicolor (sorgo)	0,035	-1,45	44	1,64	13,7	1,14
4. Mimosa caesalpinifolia (sabiã)	0,033	-1,48	148	2,17	56	1,75
5. Stryphnodendron sp. (barbatimão)	0,099	-1,00	50	1,70	6	0,78
6. Adenantha pavonina (carolina)	0,134	-0,87	211	2,32	28.152	4,45
7. Enterolobium contortisiliquum (timbauba)	0,465	-0,33	20	1,30	375	2,57
8. Caesalpinia ferrea (jucã)	0,180	-0,74	164	2,21	1.140	3,06
9. Cassia alata (manjerioba)	0,018	1,74	45	1,65	3	0,48
10. Hymenaea courbaril (jatobã)	2,600	0,41	300	2,48	265	2,42
11. Tamarindus indicus (tamarindo)	1,057	0,02	51	1,71	90	1,95
12. Canavalia ensiformis (f. porco)	1,560	0,19	146	2,16	180	2,25
13. Abrus precatorius (jiriquiti)	0,101	0,99	164	2,21	1.202	3,08
14. Dioclea sclerocarpa (mucunã negra)	11,700	1,07	350	2,54	2.990	3,48
15. Dioclea grandiflora (mucunã lisa)	10,350	1,01	107	2,03	620	2,79
16. Centrosema pubescens (jitirana)	0,030	-1,52	88	1,94	310	2,49
17. Platycyamus regnelli (mangalô)	0,274	-0,56	158	2,20	8.418	3,93
18. Erythrina velutina (mulungu)	0,505	-0,30	61	1,78	1.893	2,28
19. Crotalaria retusa (chocalho de cobra)	0,014	-1,85	44	1,64	32	1,51
20. Vigna unguiculata (seridô)	0,230	-0,64	153	2,18	2.530	3,40
21. Vigna unguiculata (pitiuba)	0,170	-0,77	167	2,22	2.402	3,38
22. Vigna unguiculata (quebra ca-deira)	0,190	-0,72	178	2,25	5.952	3,77
23. Phaseolus vulgaris (Rico 23)	0,165	-0,78	92	1,96	108.000	5,03
24. Phaseolus vulgaris (branco 623)	0,359	-0,44	70	1,84	3.200	3,50
25. Phaseolus vulgaris (vermelho)	0,356	-0,45	67	1,83	1.840	3,26
26. Glycine max (soja)	0,234	-0,63	326	2,51	12.550	4,10
27. Arachis hypogaea (amendoim)	0,515	-0,29	200	2,30	765	2,88



certa proporcionalidade entre a concentração de proteína extraída por água e a de inibidores nas sementes estudadas; uma correlação muito mais evidente foi observada por Ryan quando estudou diversos cultivares de batata (88). A significação desta correlação não é tão clara mas poderíamos imaginar que seja reflexo de uma das prováveis funções dos inibidores; como proteína de reserva especializada e devido às suas características de solubilidade pode-se imaginar que eles guardem uma correlação positiva com as proteínas do tipo albumina das sementes.

A Fig. 23. é um gráfico do logaritmo da massa da semente versus o logaritmo da concentração de inibidores de tripsina para sementes de leguminosas. Apesar do número bastante pequeno de espécies examinadas, é tentador fazer algumas generalizações. Sementes (ver Quadro III) muito pequenas (0,01 a 0,100g) e sementes grandes (1 a 10g) tem relativamente as menores concentrações de inibidores enquanto que os maiores teores estão contidos em sementes que nós chamamos de médias e onde estão concentradas sementes de espécies cultivadas (0,1 a 0,6g). O significado dessas relações, se verdadeiro, é obscuro. O que parece ser verdadeiro é que os inibidores são necessários ao metabolismo da semente e que a presença de quantidades enormes como no caso de Adenantha pavonina e Phaseolus vulgaris (Rico 23, um cultivar preto) não deve ter influência negativa na germinação da semente. Uma observação interessante que se pode fazer é que sementes grandes, Grupo IV (1 a 10g) parecem ter em comum a característica de possuírem polissacarídeos de reserva não amiláceos em grande concentração. Estes polissacarídeos são galactomananos ou do tipo amilóide (89).



3. ESTUDOS EM SEMENTES NATIVAS OU ADAPTADAS AO NORDESTE

Com a finalidade de se avaliar as potencialidades de sementes de plantas nativas ou adaptadas ao Nordeste com respeito ao seu aproveitamento como fonte de alimento para o homem ou animais domésticos, o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular apresentou em meados de 1977 à FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos da Secretaria do Planejamento) um projeto de pesquisa mais tarde aprovado, a ser desenvolvido sob a Coordenação do Dr. Renato de Azevedo Moreira (90). O embrião desse projeto foi, sem dúvida, o esforço desenvolvido desde 1965 em nosso laboratório no sentido de alongar os conhecimentos sobre teores de inibidores de tripsina em plantas do Nordeste (Quadros I, II e Tabela I). Foi proposto nesse projeto o estudo dos teores de proteína, lectinas, alérgenos e inibidores de tripsina em sementes assim como a toxicidade e valor nutritivo "in vitro" e "in vivo" bem como o desenvolvimento de métodos para eliminação de prováveis fatores tóxicos.

Na primeira fase desse projeto foram estudados, com respeito a inibidores de tripsina, 18 sementes nativas ou adaptadas. As proteínas de farinha de sementes foram extraídas com tampão borato de pH 9 e as albuminas e globulinas separadas por diálise contra ácido acético 0,033M. Os teores de inibidores de tripsina foram medidos no resíduo da extração, no extrato de pH 9,0, nas albuminas e globulinas. A Tabela II mostra os resultados obtidos. Um exame detalhado da mesma, revela aspectos bem interessantes como é o caso dos altíssimos teores de inibidores em Adenantha pavonina (carolina) e Caesalpinia ferrea (jucá), respectivamente 7,0% e 3,6, (Ver Cap. II) e as quase insignificantes concentrações em Terminalia catapa (castanhola), Cnidocullus phyllacantus (favela), Mimosa caesalpinifolia (sabiã), Cassia sericea (matapasto cabeludo), entre outras.

Vale destacar o interesse despertado pelas investigações em sementes de Artocarpus integrifolia (jaca), Anacardium

occidentale (caju) e Adenantha pavonina (carolina). A primeira, uma espécie da família Moraceae apresentou, em extratos brutos, um provável sistema enzima (tipo tripsina)/inibidor sō observado até agora em sementes de alface (91); a enzima se en contra, pelo menos em alguma etapa do desenvolvimento da semente, em quantidades equivalentes às de inibidor. A Fig. 24, representa a ação de extratos brutos de sementes de jaca sobre tripsina a pH 7,6 e o efeito do mesmo extrato sobre caseína. Evidências diretas de que o inibidor atua sobre a enzima não foram ainda obtidas (37). Em sementes de caju, que contêm uma quantidade muito baixa de inibidores (ca. de 2 µg/g de farinha delipidada), também foi possível detectar um sistema inibidor/proteinase; neste caso a proteinase foi uma enzima que hidroliza o substrato sintético, α-N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPA) que é um substrato de tripsina. Não temos evidência de que o(s) inibidor(es) de tripsina e quimiotripsina purificados da semente são os responsáveis pela inibição da peptidase (92). Em sementes de Adenantha pavonina detectamos uma quantidade de inibidores de tripsina que corresponde a mais de 1/4 da proteína solúvel da semente; acreditamos que esta semente seja a mais rica, senão uma das mais ricas em inibidores já estudadas. Inibidores de tripsina também foram detectados em folhas e em vagens desta mesma planta. É interessante notar que as folhas de A. pavonina servem de alimento a ovinos (93).

Outra observação que se pode fazer ao examinar a Tabela II é o fato da existência, em alguns exemplos de grandes quantidades de inibidores nos resíduos de extração. Este é o caso de manga (Mangifera indica), jaca dura (Artocarpus integrifolia) e feijão de boi (Canavalia brasiliensis); pelo menos neste último caso, extrações sucessivas solubilizam os inibidores presentes no resíduo (94), o que não exclue a possibilidade de associação com alguma estrutura insolúvel neste e nos outros casos.

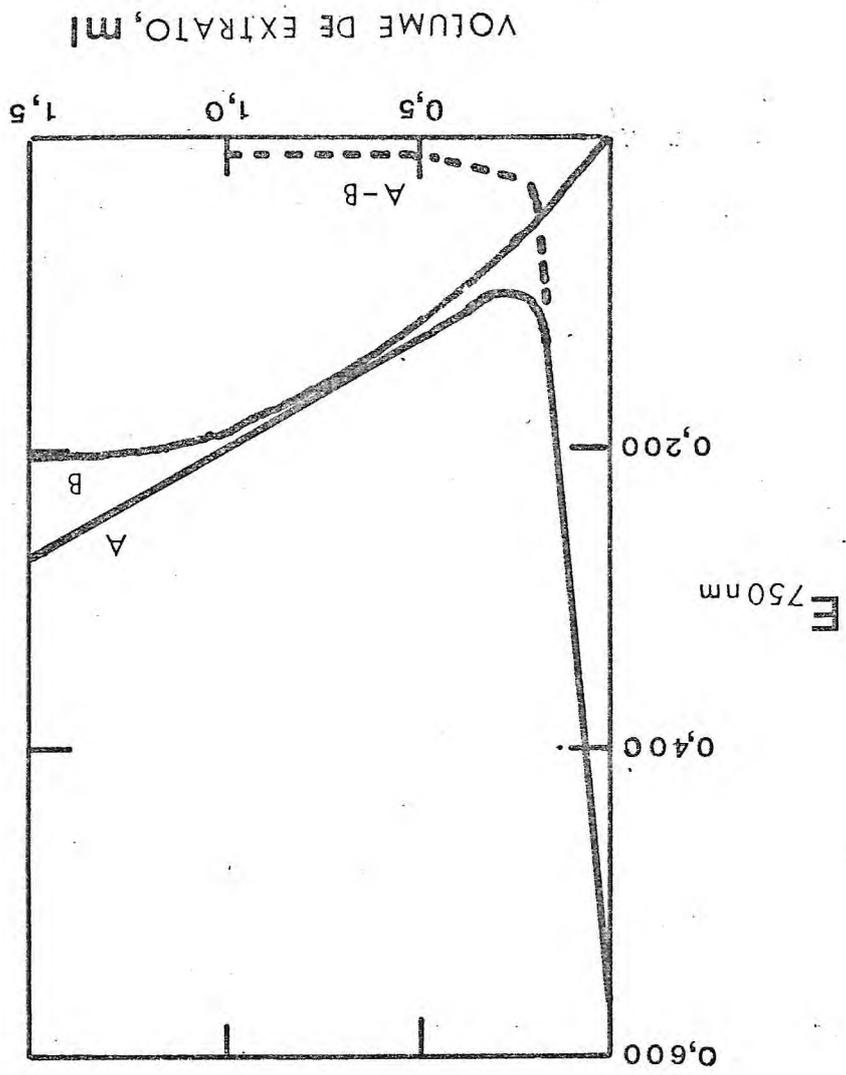


TABELA II - Atividade antitriptica de sementes de espécies nativas ou bastante encontradas no nordeste. O método utilizado na determinação da atividade antitriptica foi o de Kunitz e as unidades, as definidas pelo autor. Os extratos foram feitos em tampão borato 0,01 M, pH 10,0, NaCl 1%.

SEMENTE	ATIVIDADE ANTITRÍPTICA, UI/g DE FARINHA			
	EXTRATO BRUTO	ALBUMINAS	GLOBULINAS	RESÍDUO
<i>Anona squamosa</i> (ata)	194	89	5	-
<i>Terminalia catapa</i> (castanhola)	51	23	46	21
<i>Mangifera indica</i> (manga)	6.606	1.292	-	4.826
<i>Artocarpus integrifolia</i> (jaca dura)	1.092	3.589	1.810	3.144
<i>Artocarpus integrifolia</i> (jaca mole)	7.638	1.650	196	417
<i>Artocarpus communis</i> (fruta pão)	1.012	357	666	40
<i>Cnidocullus phyllacanthus</i> (fave-la)	9	13	16	68
<i>Mimosa caesalpinifolia</i> (sabiã)	25	-	22	754
<i>Adenantha pavonina</i> (carolina)	117.211	98.836	2.432	588
<i>Leucaena</i> sp.	2.088	1.192	1.388	1.129
<i>Pithecellobium cauliflorum</i> (cana-fistula de lagoa)	236	176	5	-
<i>Pithecellobium dumosum</i> (jurema branca)	13.775	1.512	4.900	1.562
<i>Caesalpinia pyramidalis</i> (catingueira)	29.536	6.323	2.496	1.417
<i>Caesalpinia ferrea</i> (jucã)	56.640	9.498	2.090	3.471
<i>Cassia tora</i> (mata-pasto liso)	189	86	33	-
<i>Cassia sericea</i> (matapasto cabe-ludo)	21	16	10	30
<i>Canavalia brasiliensis</i> (f. de boi)	689	456	110	1.260
<i>Dioclea grandiflora</i> (mucunã lisa)	5.895	1.824	86	-

PARTE IV - INIBIDORES EM VIGNA UNGUICULATA

1. INTRODUÇÃO

a. Aspectos botânicos e importância comercial

Desde alguns anos utilizamos o feijão de corda ou feijão macassar como material de estudo sob a denominação botânica de Vigna sinensis (L) Savi (95, 42). Recentemente Verd-court (96) em uma tentativa de estabelecer uma distinção entre os gêneros Phaseolus (L.) e Vigna (Savi) mostrou que a denominação correta dessa leguminosa seria Vigna unguiculata (L.) Walp. Este mesmo autor mostrou também que os feijões dos tipos "mung" ou "green gram", "urd" ou "black gram" e "adzuki", conhecidos botanicamente por Phaseolus mungo, Phaseolus aureus, Phaseolus radiatus, Phaseolus angularis e Phaseolus umbellatus pertencem na realidade ao gênero Vigna e são classificados respectivamente como Vigna mungo, Vigna radiata, Vigna angularis e Vigna umbellata (96).

Entre os legumes usados como alimento, os feijões do gênero Vigna, Vigna unguiculata, Vigna mungo, Vigna radiata, acima citados, representaram apenas cerca de 1% da produção mundial no ano de 1972. Em um exame mais detalhado das estatísticas, no entanto, verificamos que estes feijões representaram 13% da produção total de legumes no continente africano (97). Neste continente os principais produtores são a Nigéria, Niger, Alto Volta e Uganda que em 1970 contribuíram com 91% para o volume da produção mundial de Vigna (98).

Os feijões do gênero Vigna são cultivados também em outras regiões tropicais principalmente em zonas semi-áridas e sub-úmidas dos continentes asiático e americano (99, 100). No Brasil estes feijões, notadamente cultivares de Vigna unguiculata, são cultivados principalmente no Nordeste onde representam cerca de 70% da produção de legumes para alimentação humana.

Sua produção atingiu a 600 mil toneladas em 1973 o que representou aproximadamente 32% da produção nacional. É interessante salientar que estes números não são computados nas estatísticas de produção mundial fornecidas pela FAO (100).

No Estado do Ceará este feijão é bastante importante pois é o 4º principal produto do Estado contribuindo para ca. de 12% de sua renda agrícola.

O feijão de corda é alimento básico do nordestino juntamente com o milho, arroz e mandioca. Seu consumo atinge a 40 kg por pessoa/ano sob a forma de grão seco e em menor escala na forma de grão verde em vagem (100).

O teor de proteína se situa em torno de 25% havendo cultivares que chegam a 36% (101). A proteína extraída de Vigna, no entanto, é deficiente em metionina, cisteína e triptofano (102). Muita oportunidade para manipulação genética parece existir, de tal forma que problemas advindos da deficiência em aminoácidos essenciais são de possível resolução através de melhoramento (103).

b. Primeiros estudos sobre inibidores em Vigna

A partir dos primeiros estudos sobre inibidores de tripsina em soja (2, 3, 104) chegou-se ao consenso de que estas substâncias estão presentes em todos os legumes para os quais análises para determinar sua presença foram feitas. Os inibidores de tripsina, ainda hoje sem lhes ter sido atribuído papel definido na planta (17) e explicado a contento os efeitos possivelmente causados por sua ingestão (14), também estão presentes no gênero Vigna.

As primeiras observações sobre a existência de inibidores de tripsina em espécies do gênero foram feitas em consequência do interesse que essas substâncias despertaram do ponto de vista nutricional. Assim é que em 1947 Borchers, Ackerson e Kimmert (6) detectaram inibidores de tripsina em sementes de Phaseolus aureus e Vigna sinensis respectivamente Vigna ra-

diata e Vigna unguiculata, como aceito atualmente. Em 1950 Jaffé estudando diversas leguminosas confirmou a presença de inibidores de tripsina em Vigna unguiculata (105). Em 1953 Chattopadhyay e Banerjee (106) mostraram que não havia variação na quantidade de inibidores em sementes maduras e germinantes de Vigna mungo e Vigna radiata. Sohoni e colaboradores relataram logo depois que a atividade inibitória estava distribuída em todas as partes das plantas de Vigna radiata e em todos os estágios de desenvolvimento; observaram também que Vigna unguiculata não apresentava atividade inibitória em legumes jovens aparecendo na semente tão logo esta se forma. Este mesmo grupo confirma as observações anteriores sobre a presença de inibidores de tripsina em sementes maduras de Vigna unguiculata, Vigna mungo e Vigna radiata (107, 108, 109). Em duas outras espécies do gênero, V. angularis (82) e V. umbellata (83) anteriormente classificadas como Phaseolus (96), estes inibidores também foram detectados; em V. angularis também foi detectada atividade anti-quimiotrípica (82).

O nosso interesse nos inibidores de Vigna sempre se situou numa tentativa de compreender o papel que estas substâncias exercem no metabolismo da planta. Já no início das investigações em Vigna a importância deste papel ou papéis foi sugerida por Honavar e Sohoni (107) sem que, até hoje, se houvesse chegado a respostas ou sugestões definitivas (25). A compreensão do papel que os inibidores desempenham na planta está intimamente associada às possibilidades de manipulação genética no sentido de aumentar, por exemplo, os teores de cisteína na semente.

O nosso interesse se restringiu a princípio aos inibidores presentes em sementes e seu comportamento durante a germinação. Esta restrição se fundamentava inicialmente na tentativa de correlacionar o metabolismo dos inibidores com os processos metabólicos de utilização das reservas protéicas.

A Fig. 25 mostra sementes dos diversos cultivares de Vigna unguiculata estudadas em nosso laboratório ao longo

CE 01 Seridó



CE 11 Quebra cadeira



CE 25 Sempre verde



CE31 Pitiuba



CE 237 Jaguaribe



CE315



TVu 2027



"Red-Bow"



das investigações aqui relatadas.

2. CONCENTRAÇÃO

A concentração de inibidores de tripsina em sementes de leguminosas ou qualquer outra semente ou órgão varia bastante de espécie para espécie como pode ser visto em qualquer levantamento feito por um mesmo laboratório, utilizando o mesmo método de avaliação de concentração (ver Parte III). Variações de concentração são também observadas dentro da mesma espécie, como foi visto para Vicia faba (110).

Quando se quer comparar resultados obtidos para uma mesma espécie por diferentes laboratórios, as dificuldades advindas do uso de métodos diversos de determinação de atividade são grande empecilho (16).

Para o caso de Vigna unguiculata, no entanto, temos informações razoavelmente precisas e comparáveis de diversos grupos. A Tabela III mostra valores de concentração de inibidores de tripsina em diversos cultivares de V. unguiculata obtidos em quatro laboratórios. Apesar de algumas observações que serão feitas mais adiante a tabela ilustra bem a variabilidade intraespecífica referida anteriormente. Não temos, infelizmente, informações sobre concentrações de proteína, total ou solúvel, correspondente aos cultivares apresentados. Acreditamos que essa informação para um estudo dessa natureza seria de grande valia no esclarecimento do papel que essas substâncias exercem na planta. Uma correlação linear bastante alta foi encontrada por Ryan e col. entre o teor de inibidores de proteinases (tripsina, quimiotripsina e carboxipeptidase) e proteína solúvel de tubérculos de batata (88). Em nosso laboratório mostramos existir uma relação entre o logaritmo da concentração de inibidor e o logaritmo da concentração de proteína solúvel em água, para diversas sementes (ver Parte III, Fig. 22). À luz dessas experiências é interessante chamar a atenção para o fato de que, geralmente, os inibidores são substân-

TABELA III - Inibidores de tripsina em sementes de
Vigna unguiculata (L.) Walp.

Cultivar ou variedade	Inibidores de tripsina, %	Referências
CE 01 (seridõ)	0,25	Este trab.
CE 25 (sempre verde)	0,22	"
CE 31 (pitiuba)	0,26-0,35	"
CE237 (jaguaribe)	0,27	"
CE315	0,27	"
"Red bow"	0,79	"
CE 11 (quebra cadeira)	0,94	"
TVu 2027	1,44	"
H 81	0,64	(111)
"Red bow"	0,02	(112)
TVu 2027	0,92	(113)
TVu 4557	0,44	"
TVu 76	0,34	"
TVu 3229	0,30	"
TVu 37	0,26	"
TVu 57	0,25	"
TVu 1190E	0,23	"
TVu 1502ID	0,19	"

cias ricas em aminoácidos sulfurados e.g. cistina, ao contrário da maior parte das proteínas vegetais (27). Essa correlação observada poderia ser decorrência de atividades comparáveis dos mecanismos de síntese das proteínas de um modo geral - as proteínas de reserva - e aqueles responsáveis pela síntese dos inibidores; a correlação, portanto, não seria se não reflexo da produção paralela de ambos os tipos de proteína - as ricas em aminoácidos sulfurados e as proteínas de reserva, normalmente pobres nesses aminoácidos.

Um exame da Tabela III mostra uma discrepância entre o valor encontrado para a variedade "Red bow" no nosso laboratório e aquele calculado a partir de dados apresentados por Gennis e Cantor (112); estes autores encontraram uma concentração de 10 a 70 vezes menor do que qualquer outro cultivar listado; esta discrepância parece ser improvável e pode muito bem ser devida a uma subestimação da atividade inibitória medida no extrato bruto, associada a perdas excessivas durante a purificação mas não evidentes nas tabelas apresentadas (112). Esta última possibilidade é reforçada pelo fato de que esses autores utilizaram método desenvolvido por nós e que resulta numa perda de 75% da atividade anti-triptica na etapa inicial (42). Uma outra discrepância vista na tabela é a notada para o teor de inibidores do cultivar TVu 2027. Este cultivar, resistente ao gorgulho (Callosobruchus maculatus) e obtido no IITA (International Institute of Tropical Agriculture), Ibadan, Nigeria, foi analisado pelo Departamento de Botânica da Universidade de Durham, Inglaterra (113) e por nós. Acreditamos que o método utilizado por Gatehouse et al. (113) para calcular a percentagem de inibidor leve a valores mais baixos do que os encontrados por nós em virtude de haverem tomado como base a atividade não do extrato bruto e sim a de uma fração albumínica.

É interessante lembrar o fato de que a semente de V. unguiculata pode suportar, sem danos evidentes, variações nas concentrações de inibidores de tripsina da ordem de 5 a 7 ve-

zes, sugerindo completa inocuidade destas substâncias para a planta, o que aliás é sugerido pelas altas concentrações de inibidores encontradas em outras sementes (Parte III). Também neste contexto é interessante observar que as sementes admitem, sem terem sua formação afetada, amplos limites de variação de concentração de suas proteínas de reserva (114). Entenda-se aqui como proteína de reserva, no caso de legumes, as globulinas típicas. Variações tão grandes como as observadas para proteínas de reserva provavelmente não seriam admissíveis para as albuminas, grupo onde estão concentradas as proteínas metabólicas (115).

3. MULTIPLICIDADE

Logo no início dos estudos sobre o fator antitriptico detectado em sementes de soja foi sugerido que esta semente conteria três substâncias capazes de inibir a atividade de tripsina e que seriam distinguíveis por suas solubilidades diferentes (44). Já em 1955 Sohonie e Bhandarkar sugeriram que sementes de Vigna unguiculata conteriam dois inibidores possíveis de serem separados de acordo com sua solubilidade em sulfato de amônio (109). Evidência de que sementes de Phaseolus lunatus (fava) contêm uma família de substâncias com propriedades físicas e químicas bastante semelhantes e que inibem a atividade de tripsina, foi obtida em 1963 por Jones, Moore e Stein (116). Apesar do número cada vez maior de sementes de legumes onde se demonstra a existência de fórmulas múltiplas de inibidores (82, 112, 27, 5, 117, 118, 87, 35, 12) registros da existência de somente uma forma aparecem consistentemente na literatura; este é o caso de Arachis hypogaea (11), Vigna radiata (119) e Pisum sativum (120); nestes três exemplos parece clara a conclusão dos autores sobre a existência de somente um inibidor em cada espécie.

Em Vigna radiata, Chrispeels e Baumgartner (119) relatam a existência de somente um inibidor de tripsina sem atividade sobre quimiotripsina; com auxílio de anticorpos especí-

ficos para o inibidor isolado mostram com clareza que ele se localiza no citoplasma estando os corpos protêicos inteiramente livres da substância. Diante dos resultados obtidos por nós e por outros com relação a multiplicidade de inibidores nas espécies relacionadas Vigna unguiculata e Vigna angularis (82, 24, 35), os resultados com Vigna radiata nos parecem merecer um reestudo.

Diversos grupos têm trabalhado com inibidores de tripsina de Vigna unguiculata. Todos eles relataram estudos sobre isolamento e caracterização dessas substâncias (42, 111, 112, 113, 117, 35, 121, 122) sem, no entanto haver concordância quanto ao número de espécies ou coincidência de propriedades entre aqueles inibidores isolados.

Nesta oportunidade tentarei reunir as informações sobre o número e propriedades dos inibidores de tripsina e/ou quimiotripsina detectados em Vigna unguiculata. Esta tentativa tem o objetivo de conciliar as informações obtidas pelo nosso grupo com os resultados de outros. Esta conciliação levará certamente a uma melhor compreensão do papel ou papéis que os inibidores exercem no metabolismo da planta.

Já em 1966 quando relatamos o isolamento de um inibidor de tripsina/quimiotripsina mostramos claramente a existência de pelo menos três inibidores de tripsina sendo que desses, aquele isolado inibia quimiotripsina em sítio independente (42). Em seguida mostramos que esse inibidor tinha um peso molecular de 10.000, era rico em cistina e tinha um pI de 4,7 (121, 122). Mais tarde, o inibidor de tripsina de maior significação quantitativa no cultivar seridô foi isolado e parcialmente caracterizado, apresentando um pI de 5,0 (35). Estes dois inibidores são os mais importantes, quantitativamente, nos cultivares ou variedades por nós examinados utilizando focalização isoelétrica em placas de gel de poliacrilamida e a técnica de coramento negativo, métodos já descritos (ver Parte II).

Em investigações sobre o comportamento dos inibidores de tripsina durante a germinação de sementes do cultivar

seridõ, verificamos que uma fração correspondendo a 50-75% dos inibidores tem sua mobilização dependente da presença do eixo embrionário (ver adiante); este resultado parece ser uma indicação de multiplicidade de função, provavelmente associada a multiplicidade de forma (24). Uma outra indicação de multiplicidade, também observada durante a germinação é o aumento de inibidores nas primeiras 24 horas de germinação e entre o 3º e 5º dias para o caso dos inibidores de tripsina (ver adiante). O aumento no primeiro dia, entretanto, parece não ser devido ao aparecimento de novas formas de inibidores (25, 75). Novas formas no entanto poderiam estar implicadas no aumento de atividade entre o terceiro e quinto dias de germinação, a exemplo do que foi constatado por Pusztai para Phaseolus vulgaris (27).

O número de inibidores foi mostrado ser bem maior quando modificamos o esquema de eluição em DEAE-celulose normalmente utilizado para separação do inibidor bruto e utilizamos SP-Sephadex para purificação da fração predominantemente anti-quimiotríptica (Fig. 14, Parte II). Eletrofocalização em placas de gel de poliacrilamida e utilização do método de coramento negativo (ver Parte II) para análise quer de extratos brutos, quer de preparações purificadas, mostrou na realidade a grande complexidade do sistema de inibidores de tripsina e quimiotripsina de V. unguiculata. Extratos brutos dos cultivares seridõ, pitiuba, quebra-cadeira e da variedade americana "Red bow" apresentam 10 componentes com pIs entre 4,6 e 7,3. É interessante notar que a maior parte dos inibidores de tripsina desses cultivares corresponde provavelmente a mais de 95% do total e se concentra na região de pI de 4,6 a 5,4 (Fig. 10). Cromatografia de afinidade em colunas de Sepharose-4B-quimiotripsina de preparações dos cultivares seridõ, pitiuba e quebra cadeira sugere a existência de dois inibidores adicionais de tripsina/quimiotripsina de pIs 4,52 e 4,56 (122). Uma fração albumínica obtida de preparações de corpos protéicos da variedade "Red bow", preparados por centrifugação em gradiente de KI/glicerol e gentilmente cedida pelo Dr. Robert Begbie do The Rowett Research Institute, Aberdeen, Escócia, foi também

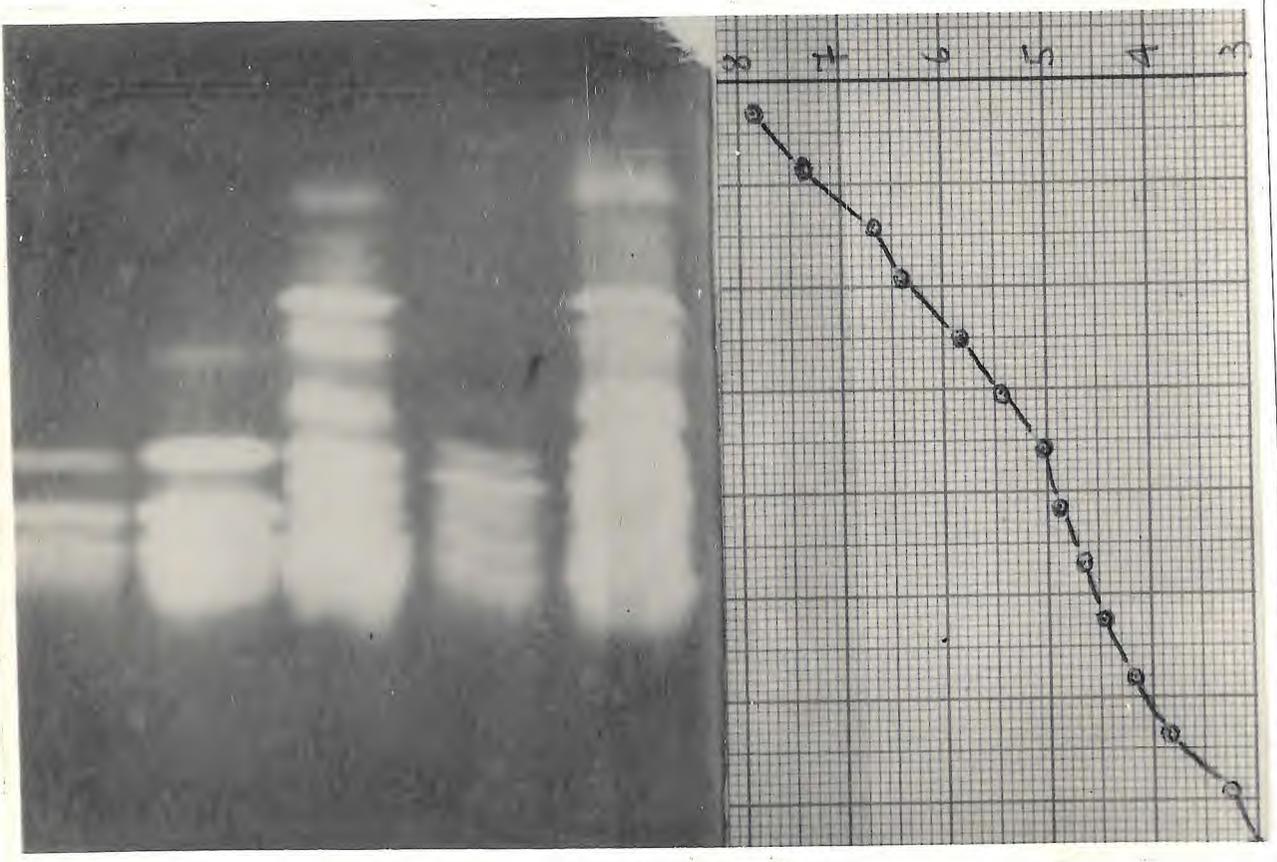
examinada por eletrofocalização em gel de poliacrilamida; nesta experiência conseguimos mostrar a presença de cerca de 14 componentes com atividade anti-trípica cujos pIs vão de 4,6 a 7,5 (Fig. 26), praticamente a mesma distribuição observada anteriormente em extratos brutos dos cultivares brasileiros seridô, pitiuba quebra cadeira e em "Red bow". É interessante notar que a fração albumínica derivada de corpos protéicos parece ser relativamente mais rica em inibidores de pIs 4,6 - 4,8 e 6,4 - 7,5 do que a fração albumínica total que cobre a região de pH de 4,6 a 7,5 (Fig. 27). A diferença numérica observada, de 10 para 14 espécies, pode ser atribuída a uma maior resolução no experimento particular. A Tabela IV mostra uma consolidação dos resultados obtidos por focalização isoelétrica de inibidores de tripsina de V. unguiculata em nosso laboratório onde o inibidor III é o inibidor de dupla cabeça isolado por Ventura e Xavier-Filho (42) e o inibidor VII é o inibidor de tripsina isolado por Xavier-Filho e Souza (35).

Recentemente se tem falado muito sobre a possibilidade de formação de artefatos em eletrofocalização devido a interações induzidas pelos anfólitos (123); a multiplicidade de formas de inibidores aqui sugerida não nos parece, no entanto, ser devida a artefatos dessa natureza; esta multiplicidade de formas já havia sido sugerida pelos experimentos com DEAE-celulose utilizando gradiente exponencial de NaCl e com SP-Sephadex, anteriormente referidos; por outro lado, as experiências de eletrofocalização foram feitas utilizando-se diferentes partidas de anfólitos além de terem sido também utilizados diferentes intervalos de pH.

Ainda recentemente em nosso laboratório, Carasco utilizando a mesma técnica descobriu um novo inibidor no cultivar seridô; este inibidor de tripsina de pI 4,4 tem peso molecular aparente de 12.500 e se encontra exclusivamente em vagens em desenvolvimento (26).

O grupo do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade de Genebra, Suíça, trabalhando com uma linha de

5 4 3 2 1



1

2

3

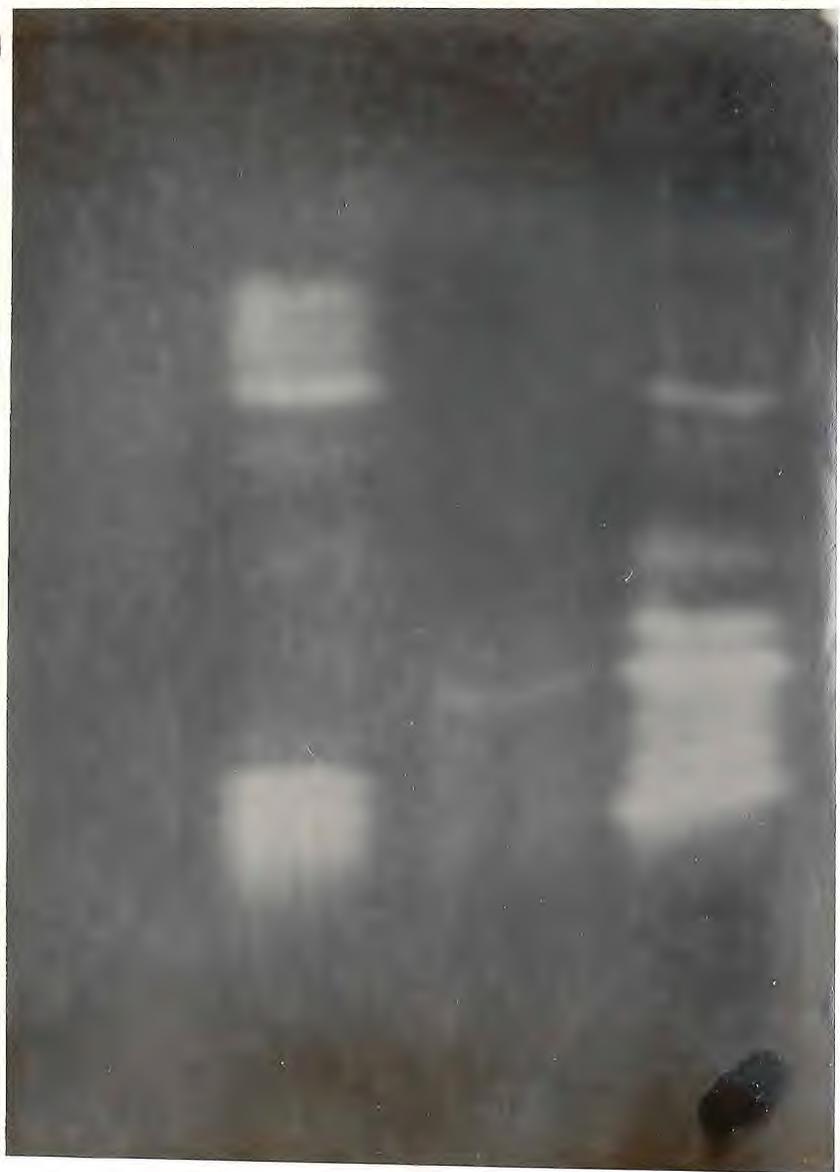


TABELA IV - Isoinibidores de Vigna unguiculata

Pontos isoelétricos das diferentes espécies de inibidores de tripsina determinados por focalização isoelétrica.

Material Inibidor	Extratos brutos	Preparações purificadas	Albuminas totais e albuminas de corpos protéicos
I	-	4,52	-
II	-	4,56	4,6
TI/QI III	4,6	4,7	4,7
IV	-	-	4,75
V	4,8	-	4,8
VI	4,9	-	4,9
TI VII	5,1	5,0	5,0
VIII	5,3	-	-
IX	5,4	-	-
X	5,9	-	5,9
XI	6,0	-	6,0
XII	-	-	6,4
XIII	-	-	6,5
XIV	6,7	-	6,7
XV	7,3	-	7,2
XVI	-	-	7,5

V. unguiculata, H81, proveniente do Zaire, sugere que os inibidores de tripsina, em número de quatro, estão distribuídos nas frações albumínicas e globulínicas e apresentam praticamente as mesmas mobilidades eletroforéticas em gel de poliacrilamida, para cada grupo; por outro lado, sugerem que os tecidos axiais possuem um inibidor adicional. Em virtude de havarem utilizado para separação dos inibidores, tripsina ligada a um suporte sólido (EMA-tripsina) lançam a suspeita de que a multiplicidade observada possa ser devida ao efeito da enzima sobre os inibidores, fato por demais conhecido (61). Tendo em vista os resultados obtidos por nós, utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida para separar os inibidores de extratos semi-purificados sem fazer uso de técnicas de afinidade (Figs. 8 e 9, Parte II) (22) e aqueles referidos acima sobre separação de inibidores por focalização isoelétrica em placas de gel de poliacrilamida somos de opinião que os resultados de Royer et al. (117) e Royer (111) refletem a multiplicidade de formas de inibidores (ver também adiante). Não há, infelizmente, referência a ponto isoelétrico, mas a informação de que o conteúdo de cistina é da ordem de 19% e o peso molecular é da ordem de 12.000 daltons sustenta a idéia de que esse grupo trabalhou com um complexo de inibidores semelhante ao por nós estudado.

Em uma série de seis trabalhos publicados numa mesma edição do "The Journal of Biological Chemistry", Gennis e Cantor (112, 124, 125, 126, 127, 128) registraram o isolamento, purificação, diversas propriedades físicas e químicas, auto-associação, formação de complexos com proteases e estudos de transferência de energia nestes complexos, de dois inibidores de tripsina de uma variedade denominada "Red bow 98% fat free black eye" que acreditamos seja uma variedade de Vigna unguiculata. Os autores enfatizam as diferenças entre os inibidores isolados e o inibidor de tripsina/quimiotripsina anteriormente isolado por nós (42). Ambos parecem ser diferentes também do inibidor de tripsina isolado posteriormente (35). É interessante notar aqui que os autores acima citados parecem não ter encontrado nenhuma indicação de uma maior pluralidade no número

de inibidores dessa variedade de V. unguiculata. Esta observação aliada a outra, anteriormente referida, de que a concentração de inibidores de tripsina, como calculada pelos dados mostrados por Gennis e Cantor é bastante baixa, da ordem de 0,02%, sugere que essa variedade é bem diferente, tanto dos cultivares por nós estudados como daqueles estudados pelos grupos de Genebra e Durham, a que nos referiremos mais adiante. Obtivemos uma partida de sementes de V. unguiculata de origem norte-americana denominada de "Red bow" mas que se enquadra, quando analisada por nós, dentro dos tipos (pIs) e valores de concentração apresentados pelos cultivares brasileiros (ver Fig. 10 e Tabela III). A inconveniência de não se utilizar nomenclatura correta é evidente nesta situação. Os inibidores isolados por Gennis e Cantor tem pIs de 5,1 (BEPCI) e 6,5 (BEPTI), valores esses que poderiam ser facilmente acomodados na Tabela IV não foram as propriedades peculiares do inibidor de pI 5,1; este é um inibidor de tripsina/quimiotripsina e que não tem similar nos cultivares por nós estudados.

Recentemente Gatehouse e colaboradores (113), no Departamento de Botânica da Universidade de Durham, Inglaterra, em um estudo onde se procurou relacionar concentração de inibidores de tripsina em cultivares de V. unguiculata com resistência a infestação por Callosobruchus maculatus sugerem que a atividade inibitória dessa leguminosa contra tripsina é devida a um inibidor mas que este apresenta-se complexo por focalização isoelétrica em placas de gel de poliacrilamida. O método utilizado pelos autores para purificação final do inibidor foi o de cromatografia de afinidade utilizando Sepharose-tripsina. Este método foi recentemente mostrado por nós não afetar o peso molecular por PAGE-SDS, o espectro de iso-inibidores visto por focalização isoelétrica e nem a recuperação da atividade anti-trípica (70). Desse modo a complexidade observada por Gatehouse et. al (113) parece ser reflexo da própria multiplicidade de formas de inibidores de tripsina de V. unguiculata e não da natureza oligomérica do inibidor (129).

As Tabelas V e VI mostram algumas propriedades e composição de aminoácidos dos inibidores de V. unguiculata mais estudados até hoje. O inibidor de tripsina/quimiotripsina (TI/QI), isolado por nós tem sido objeto de estudo continuado por parte de Ventura e colaboradores (130). O inibidor de tripsina (TI) de pI igual a 5,0 foi isolado por nós e mostrado ser inteiramente destituído de atividade anti-quimiotríptica e de não se associar em SDS 1% o que é característico de TI/QI e foi observado por Gennis e Cantor para os dois inibidores por eles isolados. Os inibidores para os quais foi feita análise de aminoácidos apresentam uma alta proporção de 1/2 cistina o que é característico neste grupo de substâncias.

Feeney e colaboradores (131) em um estudo sobre inibição de tripsina humana, plasmina e trombina mostraram que o inibidor de tripsina/quimiotripsina de uma variedade não especificada de V. unguiculata, preparado pelo método desenvolvido por nós (95) era um inibidor relativamente fraco de tripsina humana e de plasmina, não tendo ação sobre trombina. Estes resultados são interessantes a luz das supostas implicações dos inibidores de enzimas proteolíticas animais no valor nutritivo dos materiais vegetais que os contem (132).

4. LOCALIZAÇÃO

O estudo de inibidores de proteases, principalmente dos inibidores de tripsina, suscitou sempre grande interesse em virtude de sua possível contribuição para o baixo valor nutritivo de materiais vegetais utilizados na alimentação do homem e de animais. Como esses materiais, em sua grande maioria, são sementes ou tubérculos, foi nesses órgãos vegetais que a maioria das investigações sobre inibidores de tripsina foi inicialmente feita (17,8). Assim é que estas substâncias foram detectadas e isoladas de sementes de leguminosas e gramíneas e de tubérculos, principalmente de batata, uma solanácea (17,8).

TABELA V

Algumas propriedades de inibidores de tripsina isolados de sementes de Vigna unguiculata.

	TI/QI	TI	BEPCI	BEPTI
Inibição de				
tripsina bovina (mg/mg)	0,97	1,0	+	+
quimiot. " "	+	-	+	-
ϵ	8230	3308	2770	3440
pI	4,7	5,0	5,1	6,5
PM	9466	10520	8950	8200
NH ₂	6	7	5	6
NH ₂ terminal	?	?	SER	SER
Sítio ativo p/tripsina	LIS	LIS	?	?
" p/quimio	FEN	-	?	-
K diss. T	$1,4 \times 10^{-8} M$	$3,0 \times 10^{-9} M$?	?
K diss. QT	$7,6 \times 10^{-9} M$	-	?	-
Associação				
SDS	dímero	-	dímero	dímero
pH > 7	?	dímeros(?)	tetrâm.	tetrâm.
60% Na ₂ SO ₄	?	?	monômer.	monômer.
2M HCOOH	?	monômer(?)	dímero	dímero
pH < 7	monômer.	monômer.	?	?

Provavelmente em virtude das características morfológicas da maioria das sementes de leguminosas utilizadas como alimento em que o tecido de reserva é parte do embrião e ocupa a quase totalidade da semente (133), não houve uma preocupação em se tentar detectar qualquer localização preferencial de inibidores de tripsina na semente. Com relação às sementes de gramíneas, em que há uma diferenciação nítida da semente em tecido de reserva e embrião (133), cedo foi possível verificar a presença desses inibidores, tanto nos tecidos de reserva como no embrião (134). Em batata mesmo, uma localização preferencial no córtex apical do tubérculo foi registrada (135).

Foi provavelmente em uma espécie do gênero Vigna, V. radiata (ex Phaseolus aureus) que pela primeira vez se mostrou a presença de atividade inibitória contra tripsina em tecidos vegetativos; na mesma investigação foi também registrada a presença de inibidores em partes vegetativas de batata doce, uma convolvulácea (107).

Ryan tem dedicado grande parte de seus esforços na tentativa de elucidar a função ou funções de inibidores de proteases, especialmente de um inibidor de quimiotripsina, encontrado principalmente em tubérculos de batata (Solanum tuberosum) mas distribuído também em tecidos vegetativos desta e de outras solanáceas (17).

Em gramíneas os inibidores de enzimas proteolíticas parecem estar distribuídos tanto nos tecidos vegetativos (136) como na semente e aí nos tecidos de reserva e no embrião (134).

Em seguida aos estudos de Honavar e Sohnie (107), referidos acima, sobre distribuição de inibidores em Vigna radiata, onde relatam a presença de inibidores em todas as partes da planta examinadas (cotilédones, eixo embrionário, tegumento, folhas, caules, flores e vagens), Ambe e Sohnie mostraram, em Lablab purpureus e Faba vulgaris a presença de inibidores de tripsina em todas as partes de sementes germinantes e plantas em todos os estágios de desenvolvimento (137,138). Birk e Waldman, por outro lado, não detectaram qualquer atividade

inibitória em folhas, caules ou vagens de soja (139). Os resultados iniciais obtidos pelo grupo de K. Sohnie parecem atualmente inteiramente confirmados.

A distribuição de inibidores nas plantas, principalmente leguminosas — as mais estudadas — parece na realidade não estar restrita às sementes. Assim é que Weder em trabalho recente, mostrou a presença de inibidores de tripsina e quimiotripsina em goma arábica e goma catechu, produtos de duas mimosoídeas respectivamente, Acácia catechu e A. Senegal(78). Em nosso laboratório, Geruza Maia demonstrou recentemente a presença de inibidores em folhas e vagens verdes de Adenantha pavonina, também uma mimosa (140).

Em nossos estudos sobre a mobilização de inibidores de proteínases durante a germinação de Vigna unguiculata mostramos que os inibidores de tripsina se distribuem entre os cotilédones, eixo embrionário e tegumento (Tabela VII). É interessante notar a concentração de inibidores duas vezes maior no eixo embrionário do que nos cotilédones(24). Concentrações sistematicamente mais altas nos eixos embrionários de outras sementes de leguminosas têm sido encontradas (94). Recentemente, em nosso laboratório, Carasco confirmou a sugestão anteriormente avançada de que a atividade inibitória encontrada no tegumento seria não específica (24,26).

Em estudos mais recentes mostramos que a distribuição de inibidores de tripsina e quimiotripsina em cotilédones embebidos de Vigna unguiculata apresenta um gradiente de concentração que cresce a partir das porções distais atingindo valores consideravelmente mais altos nas porções proximais, culminando com concentrações cerca de duas vezes maiores nos eixos embrionários (Tabela VIII).

Utilização da técnica de coramento negativo empregando Acetil-fenilalanina - β - naftil ester (APNE) como substrato para tripsina e quimiotripsina (ver métodos), sobre cortes transversais de cotilédones mostrou uma distribuição preferencial dos inibidores das duas enzimas nas regiões próximas ao

TABELA VII - Distribuição de proteína, atividade anti-trípica e peso fresco em Vigna unguiculata cv. seridõ. Cada valor é uma média de pelo menos oito análises.

Parte da semente	Atividade inibitória - tripsina inibida, µg/parte	Proteína, mg/parte	Peso fresco, mg/parte
Cotiledone*	1236,0	62,2	197,6
Eixo embrião	37,4	2,6	3,4
Tegumento	52,3	-	24,8

* Dados correspondem a dois cotilédones

hilo e em torno dos feixes vasculares (Fig. 32) (25).

Estas informações sobre localização tissular nas sementes de Vigna unguiculata, embora não apontem uma função para os inibidores são, a nosso ver, indicativas de necessidades locais diferenciadas destas substâncias. Estas necessidades diferenciadas poderiam ser reflexo de suas prováveis funções reguladoras e/ou de reserva.

Carasco, trabalhando com o cultivar seridô, sugere que os inibidores de tripsina são sintetizados sequencialmente nas sementes e apresenta evidências para a existência de um inibidor em vagens verdes (26).

É evidente que um grande passo para a compreensão do papel ou papéis que esses inibidores exercem tanto no metabolismo da planta e mais particularmente na semente como no valor digestivo dos materiais que os contêm, será dado quando sua localização subcelular estiver inteiramente esclarecida. Investigações em diversas espécies tem mostrado resultados discrepantes com respeito a uma localização particulada ou citoplasmática para os inibidores (17,8).

Corpos protéicos, as organelas celulares que contêm principalmente proteínas de reservas e se encontram normalmente em tecidos de reserva, como sementes (141) são encontrados também em vacúolos de células jovens de batata e fumo(17). Os corpos protéicos de sementes tem origem ainda hoje disputada. Alguns investigadores, no entanto, acreditam que eles possam ter uma origem dupla, ou seja, a partir da fragmentação do vacúolo central único e de vesículas originadas do retículo endoplasmático (142,143,144). Estas evidências de origem dupla parecem ser razão suficiente para explicar a possível existência de corpos protéicos morfológicamente diferentes, pelo menos em cotilédones de leguminosas (143,144,145). Além de diferenças nas populações de corpos protéicos uma distribuição preferencial dessas populações em cotilédones de Lupinus luteus foi observada (145).

Fortes evidências de que inibidores de proteases, mais especificamente de quimiotripsina, são acumulados transitoriamente em corpos protéicos vacuolares de células meristemáticas de batata e fumo, foram obtidas por Ryan e seu grupo (17). Com relação a corpos protéicos de sementes e em especial de semente de leguminosas não existe concordância nos resultados sobre se os inibidores de proteases e, neste caso mais especificamente os inibidores de tripsina, estão localizados no interior dessas organelas ou se são citoplasmáticas (74, 120, 19, 143, 146, 147, 119).

Resultados obtidos por nós em 1973 com Vigna unguiculata sugerem uma distribuição de inibidores de tripsina entre frações solúveis e particuladas (74). Estes resultados estão de acordo com outros obtidos por alguns investigadores como Pusztai e col. trabalhando com Phaseolus vulgaris (147), Hobday et al. , trabalhando com Pisum sativum (120), Chrispeels trabalhando com Vigna radiata (119,19), e Miege e col. trabalhando com Lablab purpureus e P. vulgaris (143,146). Em todas as comunicações acima referidas há indicação de associação dos inibidores com frações particuladas. Outros resultados obtidos por nós parecem indicar que uma fração diferenciada do complexo de inibidores V. unguiculata, variedade "Red bow" está associada à fração albumínica isolada de corpos protéicos (Figs. 26 e 27). Recientemente Denize Souza, de nosso laboratório, utilizando tetracloreto de carbono com densidades convenientemente ajustadas com éter de petróleo (148) obteve, a partir de farinha do cultivar seridô, uma partícula rica em proteína (71%) contendo uma proporção relativamente alta de inibidores de tripsina e quimiotripsina; chegando, respectivamente a cerca de 3,2 e 3,3 vezes os valores encontrados para a semente (149).

Em investigações relacionadas com a mobilização de inibidores de tripsina e quimiotripsina no cultivar seridô, mostramos que há um aumento considerável de ambas atividades durante as primeiras 24 horas de embebição (75). Estes inibidores em excesso dos normalmente extraídos da semente quiescente

com tampão fosfato ou borato são extraídos com auxílio de solventes comumente utilizados para solubilização de proteínas ligadas a membranas (25). Estes resultados parecem confirmar a hipótese levantada por Liener (150) de que resíduos de extração de soja com baixa atividade antitriptica que causam hipertrofia pancreática conteriam inibidores de tal maneira complexados que não seriam detectados "in vitro".

Uma das evidências mais fortes para a localização citoplasmática de pelo menos um inibidor de tripsina foi obtida por Chrispeels e Baumgartner, trabalhando com cotilédones de Vigna radiata (119). Estes autores, utilizando anticorpos fluorescentes monoespecíficos contra o que eles chamam de o inibidor de tripsina isolado da semente, após a reação antígeno-anticorpo, detectaram fluorescência somente no citoplasma; os corpos protéicos não apresentaram qualquer fluorescência. É interessante chamar a atenção para o fato de que ao trabalharem com somente um inibidor de V. radiata, embora não haja base segura para se acreditar que essa espécie só contenha um inibidor (ver atrás), os autores podem ter obtido um anti-soro específico para somente este inibidor (118) deixando de detectar pois outros inibidores de tripsina. Desse modo a evidência da localização citoplasmática fica restrita a somente uma espécie.

Diante dos resultados e observações relatados acima, obtidos em diversos laboratórios e no nosso próprio (24,149) podemos propor duas possibilidades para o interrelacionamento entre inibidores de tripsina e corpos protéicos, pelo menos em sementes de leguminosas. Na primeira hipótese, os inibidores teriam uma localização citoplasmática bem exemplificada pelo trabalho de Chrispeels e Baumgartner em Vigna radiata (119). Durante os processos de extração de corpos protéicos, utilizando-se solventes aquosos, onde estas organelas parecem ser extremamente instáveis (151), haveria oportunidade para complexação dos inibidores com a membrana das partículas. O resultado seria a co-sedimentação dos inibidores com os corpos protéicos e a possibilidade de quebra dos complexos por diluição (120, 146).

A outra hipótese se assentaria na possibilidade da existência de diferentes tipos de corpos protéicos, referida acima. Esta diferença de tipos poderia acarretar diferenças no equipamento protéico destas organelas (152). Esta hipótese explicaria, por exemplo, os dados de dissociação de inibidores de tripsina de corpos protéicos referidos por Hobday et. al. (120); estes autores não conseguiram dissociação de uma fração correspondente a 25% da quantidade de inibidores do homogenato inicial. Explicaria os resultados de eletrofocalização de inibidores de tripsina de uma fração albumínica de corpos protéicos distintamente diferentes qualitativamente dos inibidores extraídos com as albuminas totais (Fig. 26 e 27). Esta hipótese estaria provavelmente de acordo com investigações recentes em corpos protéicos de sementes de mamona onde foram encontradas altas concentrações de proteínas de baixo peso molecular (~ 10.000 daltons), ricas em cistina, localizadas na matriz dos corpos protéicos e que são caracteristicamente albuminas (153). Embora pareça não haver atividade inibitoria contra tripsina (154) ou que esta seja muito baixa (78a) nessa semente, a possibilidade de um paralelismo entre essas albuminas de reserva de baixo peso molecular e os inibidores de tripsina e de um modo geral os inibidores de enzimas proteolíticas, parece ser evidente.

5. METABOLISMO

A compreensão dos processos metabólicos que levam à síntese e degradação dos inibidores de proteases animais e mais particularmente dos inibidores de tripsina em plantas está intimamente ligada ao esclarecimento do papel ou papéis que estas substâncias exercem no metabolismo da planta.

Sohonie e seu grupo (107,137,138) e Birk e Waldman (139) foram, provavelmente, os primeiros a estudar o desenvolvimento da atividade anti-trípica em tecidos vegetativos. Os primeiros detectaram inibidores em todos os tecidos em desenvolvimento de Ipomoea batata, Vigna radiata, Faba vulgaris e

Lablab purpureus mostrando um descréscimo de concentração em todos os órgãos com o desenvolvimento, a exceção da semente no caso dos legumes e dos tubérculos em I. batata onde o acúmulo de inibidores é evidente (107,138). Birk e Waldman não encontraram inibidores de tripsina em folhas, caules e vagens vazias de três variedades de soja havendo, entretanto, detectado grande quantidade em sementes jovens (139).

Posteriormente Ryan demonstrou a presença de inibidores de quimiotripsina em tecidos vegetativos de batata (Solanum tuberosum) havendo um acúmulo nos tecidos de reserva (tubérculos) a medida que diminue nos tecidos vegetativos. Por outro lado, mostrou acúmulo de inibidores de quimiotripsina em folhas jovens, lançando a hipótese de que seriam proteínas de reserva transitória, desaparecendo logo que as células atingem a maturidade(17)

Kirsi e Mikola demonstraram a presença de inibidores de proteases em folhas de plântulas de cevada; estes inibidores foram detectados em quantidades moderadamente altas nos primeiros estágios de desenvolvimento e menores níveis até ausência em folhas maduras (134,136). A observação de que o acúmulo de inibidores de proteinases de um modo geral se dá nos frutos em desenvolvimento também foi feita para essa espécie (155)..

Além dos trabalhos pioneiros de Sohoni e colaboradores (107,137,138) e de Birk e Waldman (139) nenhum estudo posterior foi feito sobre o desenvolvimento da atividade de inibidores de enzimas proteolíticas e em particular de inibidores de tripsina durante o desenvolvimento ontogenético de leguminosas. Recentemente, em nosso laboratório, Carasco mostrou que os inibidores de tripsina são sintetizados sequencialmente durante o desenvolvimento do fruto de Vigna unguiculata cv. seridô (26); os inibidores de tripsina aparecem nos cotilédones antes do inibidor de tripsina/quimiotripsina. É interessante notar que o máximo de atividade anti-triptica encontrada por Carasco durante o desenvolvimento é igual ao encontrado na se-

mente após 24 horas de embebição (25). Carasco também mostrou a existência de um inibidor nas vagens, aparentemente diferente daqueles detectados na semente e que desaparece nesse órgão antes da maturação da semente (26).

O estudo do comportamento dos inibidores de tripsina durante a germinação de sementes, principalmente de sementes de soja e outras leguminosas, mereceu sempre maior atenção que os estudos durante o desenvolvimento ontogenético. Isto é facilmente compreensível quando se atenta para os motivos que levaram à descoberta dos inibidores em soja (ver Parte III). O interesse em se averiguar se o aumento do valor nutritivo de sementes de leguminosas com a germinação estaria de algum modo relacionado ao comportamento dos inibidores de tripsina durante este processo, levou a uma série de investigações (para os trabalhos pioneiros ver ref. 27). De um modo geral estes estudos mostraram não haver variação apreciável nas quantidades de inibidores com a germinação, enquanto o valor nutritivo das sementes aumentava.

Após estes estudos iniciais devotados à compreensão do possível interrelacionamento entre a presença de inibidores de tripsina e o valor nutritivo de sementes que os contêm, teve início a fase atual que se caracteriza pelo interesse em contribuir para o esclarecimento do papel ou papéis que essas substâncias possam exercer no metabolismo vegetal. As investigações iniciais foram, compreensivelmente, dirigidas para a tentativa de explicar a presença de inibidores de tripsina em plantas como fazendo parte de um sistema de controle onde proteases do tipo tripsina estivessem envolvidas. Shain e Mayer demonstraram a existência, em sementes germinantes de alface, de um sistema inibidor de tripsina/enzima tipo tripsina; a atividade da enzima aumenta durante a germinação enquanto o inibidor desaparece (156,91). Este talvez seja o único caso em que uma relação mais estreita foi demonstrada entre os inibidores de tripsina e tripsina endógena em sementes sugerindo controle da mobilização de reservas protéicas através desse sistema. Estudos com outras sementes também foram feitos havendo

evidências, embora sejam frágeis, de que sistemas desse tipo possam existir nos materiais estudados (ver 17 e 8).

No espaço de menos de um ano, em 1972/73, três comunicações trataram, independentemente, do comportamento dos inibidores de tripsina durante a germinação de sementes de leguminosas (27, 24, 120). Pusztaí, trabalhando com Phaseolus vulgaris mostrou haver um aumento de inibidores durante os primeiros dias de germinação, aumento este devido ao aparecimento de novas formas seguindo-se o desaparecimento gradual durante o processo; o autor sugere que os inibidores não estariam envolvidos no controle da atividade proteolítica mas que em virtude de seu alto teor em cistina estariam funcionando como uma fonte deste aminoácido ou de enxofre (27). Hobday e colaboradores também mostraram o decréscimo de atividade anti-tríptica com a germinação e mostraram uma ligeira inibição da atividade azoglobulítica da semente germinante por extratos ricos em atividade anti-tríptica; mesmo assim sugerem que esta atividade não estaria relacionada com o controle da degradação de proteínas na semente (120).

A outra comunicação, das três acima referidas, originou-se no nosso laboratório (24). O material estudado foi o cultivar seridô de Vigna unguiculata. Neste trabalho também mostramos que a atividade anti-tríptica decresce com a germinação atingindo valores insignificantes pelo último dia; isto é mostrado tanto pelas curvas de atividade ao longo da germinação como por filtração em gel de dextrana dos extratos obtidos de cotilédones germinantes, como mostra a Fig. 28.

A multiplicidade de formas, anteriormente mostrada por nós (42) e já relatada acima foi bastante evidente tanto pelo comportamento dos inibidores em filtração de gel como nas experiências em que ficou demonstrado o envolvimento do eixo embrionário na degradação dos inibidores durante o processo germinativo (Fig 29); mostramos que a presença do eixo era necessária para a mobilização de uma fração da atividade que corresponde a 50-75% da atividade inicial. Neste trabalho sugeri-

mos que o papel dos inibidores na planta seria diferente daquele exercido pela maioria das proteínas da semente uma vez que eles pareciam ser mobilizados de maneira diferente destas. Uma outra sugestão feita nessa ocasião, mas já comunicada anteriormente (157), foi a de que apesar de termos detectado uma pequena inibição de proteases endógenas por uma preparação concentrada de inibidores de tripsina não achávamos que o papel destes estaria relacionado com o controle dessas enzimas; sugeríamos então a existência de inibidores específicos para proteases endógenas e isto mais tarde mostrou-se ser o caso para Vigna radiata (19). Recentemente em uma extensão desse trabalho (25) mostramos que, tanto os inibidores de tripsina como os de quimiotripsina aumentam nos cotilédones durante as primeiras 24 horas de embebição e que há um aparecimento provável de novas formas de inibidores de tripsina no quinto dia de germinação; no eixo embrionário no início do processo há um decréscimo imediato e acentuado no órgão como um todo e que persiste para o hipocótilo e radículas mas que se inverte, isto é, há aumento no epicótilo e plúmulas, a partir do quinto dia de embebição (Tabela VIII). Este aumento parece estar em consonância com as investigações de Ryan sobre o acúmulo de inibidores em folhas jovens e sua hipótese sobre a transitoriedade dessas proteínas (17). A existência de um gradiente de concentração de inibidores nos cotilédones, crescente a partir das porções distais atingindo um máximo nas porções proximais e culminando com concentrações 1,7 a 3,2 vezes maiores no eixo, em sementes embebidas por 4 horas (Figs. 30 e 31 e Tabela VIII) e observações feitas em outras sementes de que inibidores de tripsina têm uma concentração normalmente maior no eixo embrionário (94), reforçam a suspeita de um papel de reserva para essas proteínas. Outra observação interessante, feita com auxílio de cortes transversais de cotilédones submetidos à técnica de coramento negativo com APNE (Fig. 32) foi a de que a mobilização dos inibidores se dá a partir de regiões afastadas do hilo e dos eixos vasculares, seguindo, aparentemente, o mesmo padrão de mobilização de proteínas.

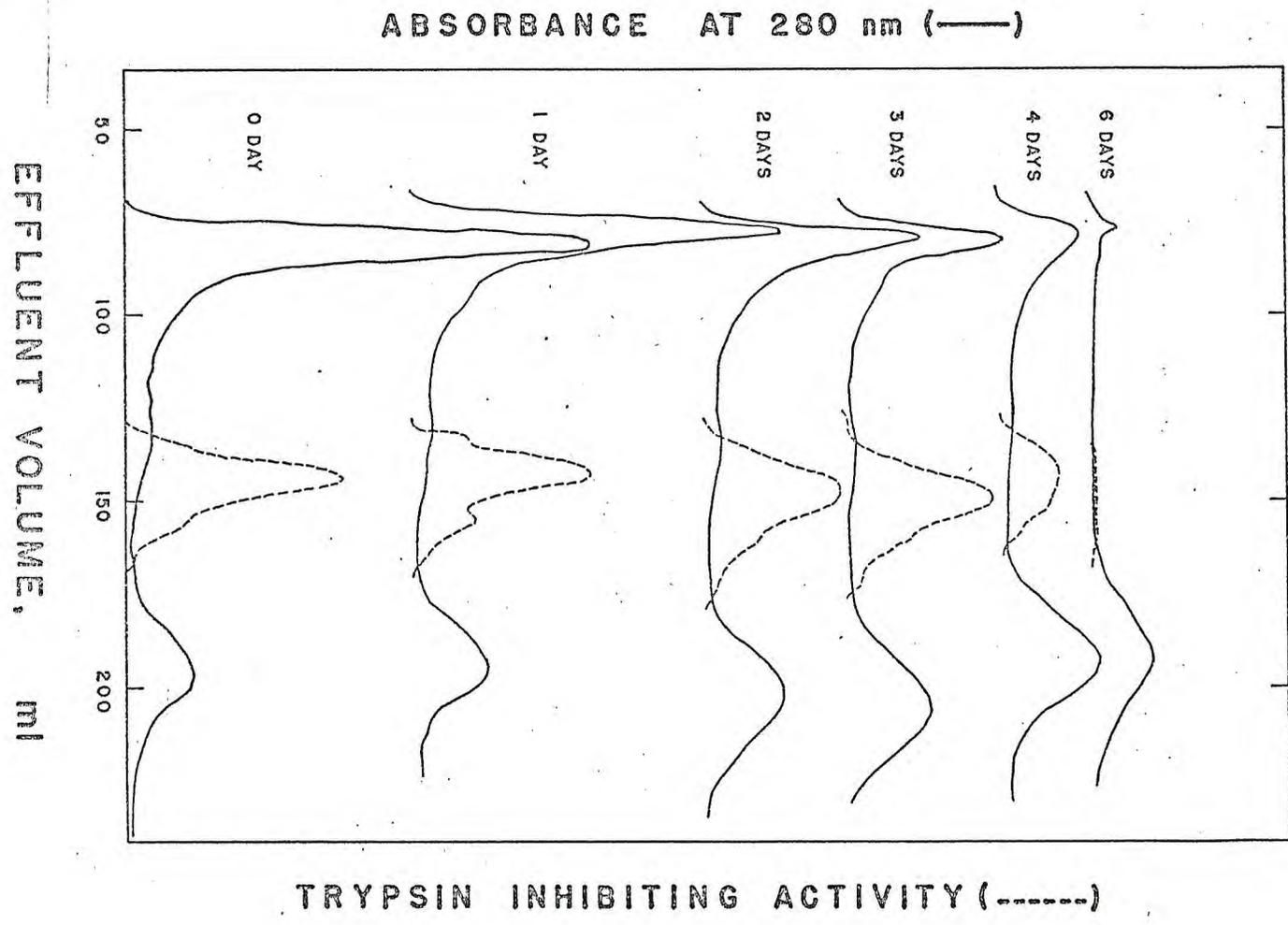
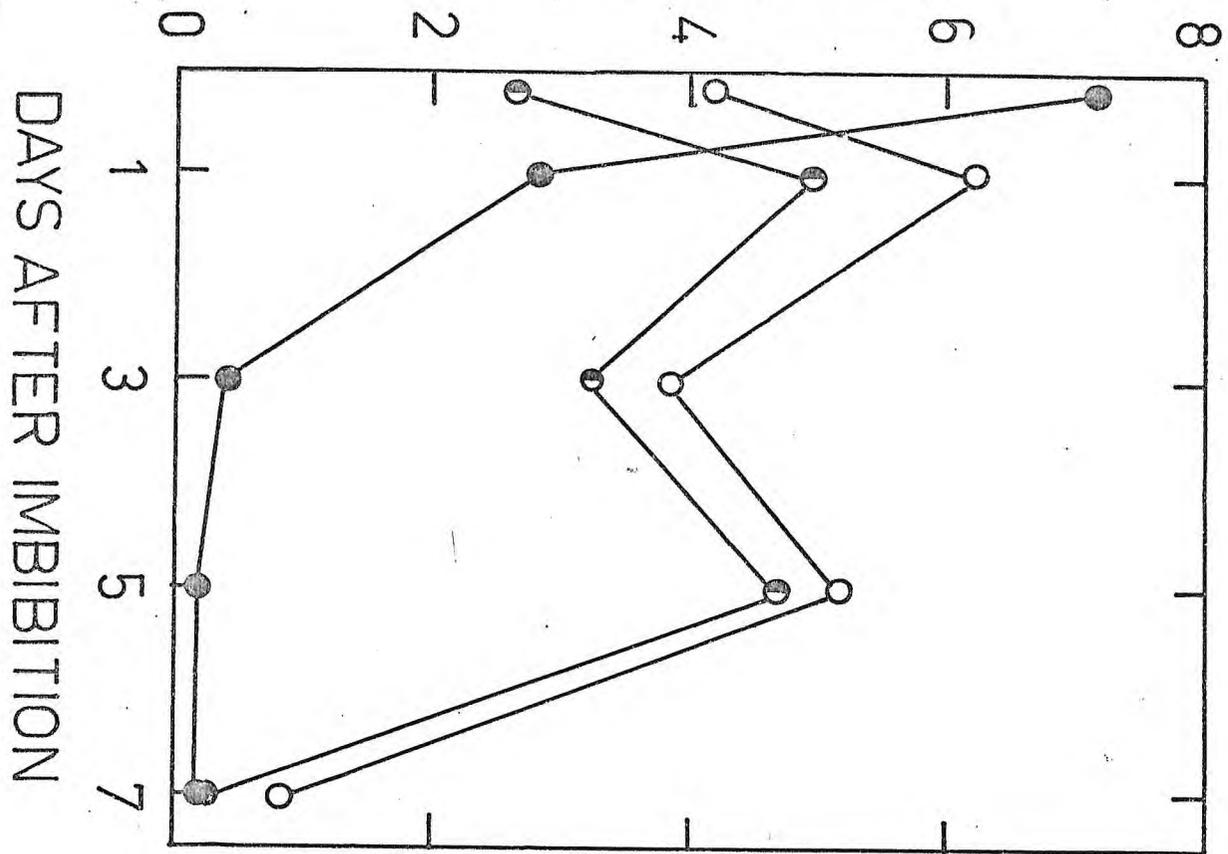


Fig. 29 - Efeito do eixo embrionário sobre a atividade anti-tríptica de cotilédones de Vigna unguiculata cv. seridô durante a germinação. (1) curva normal; (2) eixos retirados 1 dia após embebição e cotilédones deixados em placas de petri sobre papel de filtro umedecido; (3) mesmo que a curva (2) mas os eixos foram retirados após 3 dias de germinação; (4) eixos retirados após 3 dias de germinação; (4) eixos retirados nos dias mostrados na abcissa e os cotilédones deixados como em (2) até completarem 5 dias.

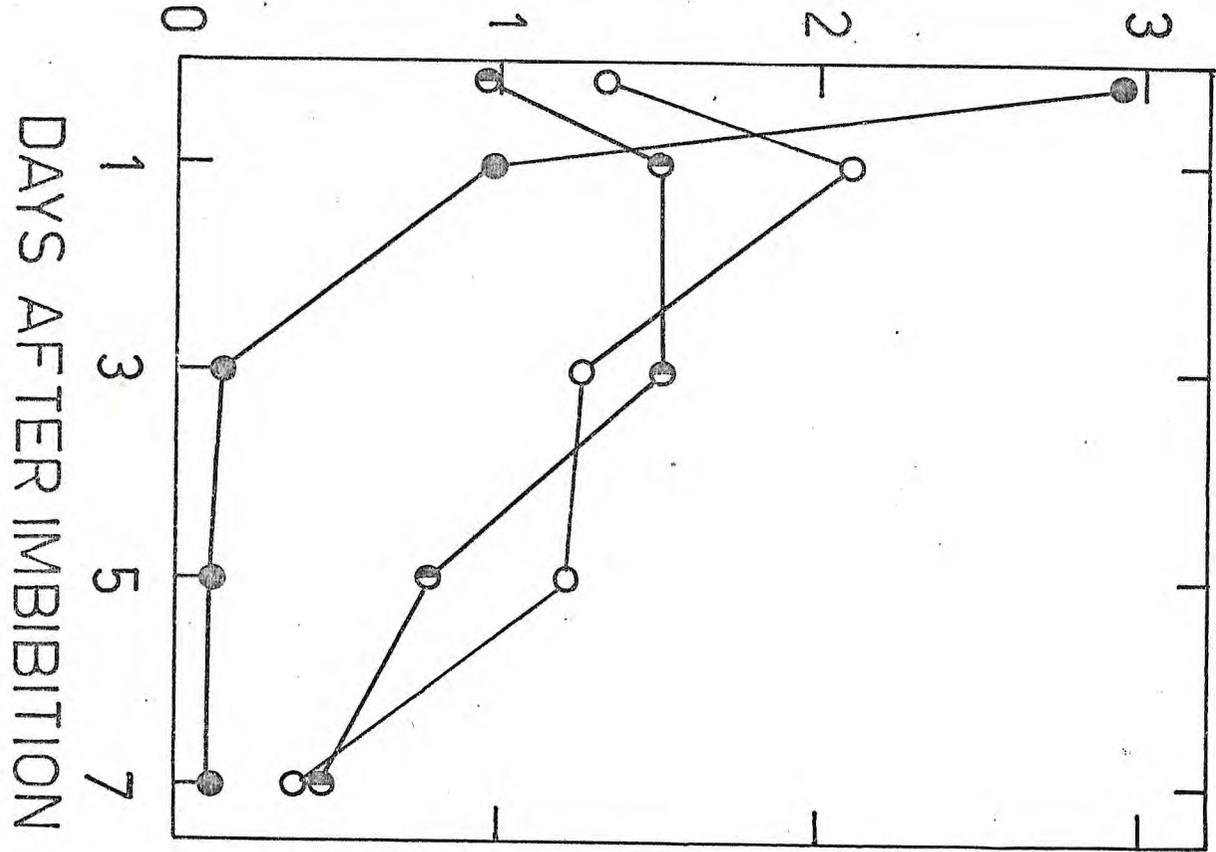
TABELA VIII - Atividades anti-tríptica (UIT) e anti-quimiotríptica (UIQ) de diferentes partes das sementes de Vigna unguiculata cv. seridõ durante a germinação. SD, SM e SP se referem as secções distal, mediana e proximal de cotiledones: E é o eixo embrionário, HR é o hipocótilo mais radículas; EP é o epicótilo mais plúmulas e ET (eixo total) é a soma dos valores correspondentes a HR e EP.

Tempo após embebição	Parte	Unidades de inibidor.semente ⁻¹		
		UIT	UIQ	UIT/UIQ
4 horas	SD	180,5	65,1	2,8
	SM	233,7	69,2	3,4
	SP	279,5	88,3	3,2
	E	24,0	9,8	2,4
1 dia	SD	289,6	87,0	3,3
	SM	315,5	97,3	3,2
	SP	314,8	105,5	3,0
	A	17,6	6,0	2,9
3 dias	SD	160,6	75,9	2,1
	SM	194,7	59,6	3,3
	SP	173,3	58,4	3,0
	ET	9,9	3,4	2,9
	HR	8,1	2,8	2,9
	EP	1,8	0,6	3,0
5 dias	SD	87,9	14,2	6,2
	SM	102,2	26,8	3,8
	SP	101,1	23,7	4,3
	ET	6,6	3,8	1,7
	HR	3,7	2,2	1,7
	EP	2,9	1,6	1,8
7 dias	SD	0,9	1,8	0,5
	SM	3,2	1,6	2,0
	SP	4,4	1,9	2,3
	ET	6,6	4,7	1,4
	HR	1,8	2,1	0,9
	EP	4,8	2,6	1,8

TRYPsin INHIBITING ACTIVITY
TIU .mg dry weight⁻¹



CHYMOTRYPSIN INHIBITING ACTIVITY
CIU.mg dry weight⁻¹



A compreensão dos processos de mobilização dos inibidores de tripsina em Vigna durante a germinação é importante para o entendimento de seu papel no metabolismo vegetal. Tendo em vista contribuir para um provável entendimento deste papel, sugerimos em 1973 (24) o possível envolvimento de um sistema enzimático capaz de reduzir as ligações dissulfeto dos inibidores tornando-os susceptíveis ao ataque de proteases; essa sugestão foi baseada em experiências relatadas por Ghetie (158) e no fato de que uma enzima capaz de reduzir ligações dissulfeto de proteínas em presença de NADPH fora descrita por Hatch e Turner (159). Utilizando técnica descrita por estes autores obtivemos uma preparação enriquecida nessa atividade, a partir de cotilédones germinantes de V. unguiculata; a ação dessa enzima, no entanto, não afetou as atividades anti-trípticas ou anti-quimiotrípticas do inibidor bruto de semente (ver Parte II) (160). É interessante registrar que em 1976, Gennis e Cantor, trabalhando com a variedade norte-americana "Red bow" de V. unguiculata especularam, baseados em um aumento de atividade azoalbumínica a pH 7,0 em presença de NADPH, que um complexo protease-inibidor seria desfeito pela ação de uma dissulfeto redutase de proteína agindo sobre o inibidor (112). Os resultados de Chrispeels e Baumgartner sobre a ação de uma endopeptidase sintetizada "de novo" em cotilédones germinantes de V. radiata na degradação do inibidor de tripsina por eles isolado são, a nosso ver prejudicados pelo fato de que, aparentemente, os autores trabalharam com uma mistura de inibidores cuja estrutura primária parece bastante comprometida pelas passagens sucessivas da preparação de inibidor por colunas de Sepharose-tripsina (119).

Recentemente conseguimos mostrar que, com auxílio de uma preparação enriquecida de inibidores do cultivar seridõ quando presa a Sepharose-4B e utilizada em forma de coluna, pelo menos cinco componentes presentes em extratos de sementes germinantes ou quiescentes da semente são retidos; uma fraca atividade caseinolítica a pH6 foi mostrada para o total dessas proteínas retidas bem como uma atividade anti-tríptica baixa mas reprodutível; não conseguimos demonstrar nenhuma ação des-



sas proteínas sobre as atividades anti-trípica e anti-quimio-trípica da preparação semi-purificada de inibidores de seridô (161). A presença de inibidores nas frações retidas, eliminada a possibilidade de liberação da coluna, pode ser explicada pelas propriedades de associação características desses inibidores (35); a fraca atividade caseinolítica poderia ser explicada tanto pela complexação da atividade proteolítica anteriormente mencionada (24, 157) como pela complexação da endopeptidase descrita por Chrispeels(162).

PARTE V - CONCLUSÕES

Qual seria o papel ou papéis exercidos pelos inibidores de tripsina nas plantas?

Esta foi a pergunta para cuja resposta nos propusemos contribuir quando iniciamos nossos estudos sobre inibidores. No entanto, para respondê-la teremos quer ver os inibidores de tripsina, não como uma classe de substância caracterizada por inibir tripsina, uma enzima proteolítica de origem animal. O fato de que tenhamos usado tripsina como modelo e este fato tem razões históricas, tem causado, a nosso ver, limitações muito grandes na interpretação dos estudos sobre a significação fisiológica dos inibidores para as plantas. A procura de funções nas plantas para inibidores de tripsina e mesmo para inibidores de outras enzimas animais está limitada principalmente pelo fato de que talvez não haja um sistema proteolítico semelhante em vegetais ou, em caso positivo, este sistema não é quantitativamente importante; as altas concentrações de inibidores de tripsina encontradas em muitas sementes, aliadas ao fato de que as constantes de associação entre a enzima e os inibidores é extremamente alta, reforçam a idéia de que os inibidores de tripsina não estão presentes na planta para inibirem enzimas tipo tripsina.

As enzimas proteolíticas de um modo geral são classificadas em quatro grupos principais; as do tipo serina, as do tipo sulfidril, as metalo-proteinases e as proteinases ácidas. Poderíamos listar um número bastante grande de exemplos nos quais inibidores protéicos de enzimas pertencentes a cada um desses grupos foram encontrados em plantas e microorganismos. Consultas a revisões recentes como as de Ryan(17) e Richardson (8) são, no entanto, suficientes para comprovar o que afirmamos. É interessante acrescentar que as enzimas proteolíticas utilizadas para esses estudos acima referidos, são originadas das mais diversas fontes; desde mamíferos, até bactérias, passando pelo exemplo bastante interessante de enzimas proteolíticas de insetos (17); mesmo em sementes foram encontradas enzi-

mas com especificidades provavelmente diferentes de tripsina e inibidas por proteínas encontradas no mesmo material (8).

No contexto acima é interessante referir os exemplos encontrados durante nossas investigações. A inibição de uma BAPAase de sementes de caju por uma fração enriquecida em inibidores de tripsina da mesma semente é indicativa da existência provável de inibidores de outras enzimas em preparações desse tipo; é interessante notar que esta semente é extremamente rica em proteínas de baixo peso molecular, solúveis em TCA e resistentes ao calor, propriedades características dos inibidores (92). Outro exemplo digno de nota é o caso da inibição de duas enzimas ácidas de Callosobruchus maculatus (gorgulho) por uma preparação de feijão seridô, rica em inibidores de tripsina (163). Esta preparação contém cerca de 62% de inibidores de tripsina mas parece conter outras proteínas tão resistentes aos métodos de preparação como os inibidores (92). Outro exemplo que seria interessante citar aqui, pois aparenta ser um dos poucos sistemas inibidor de tripsina/enzima tipo tripsina encontrados em sementes é o caso daquele referido na Parte III (Fig. 24)', encontrado em sementes de jaca (Artocarpus integrifolia); neste caso, embora os estudos estejam em fase preliminar a enzima parece ser do tipo tripsina, pelo menos no que diz respeito as condições ótimas de pH e temperatura (37).

Inibição de enzimas não proteolíticas animais, envolvidas ou não em processos digestivos, por extratos de materiais vegetais tem sido também observada (7). Inibidores de α -amilase pancreática, estáveis ao calor em pH ácido, foram detectadas em sementes de leguminosas por Jaffé e col. (9).

Recentemente Shaltiel e col. trabalhando com quinase de proteína dependente de cAMP, extraída da mucosa intestinal de rato, mostraram ser a enzima fortemente inibida pelo inibidor de soja (Kunitz). O fato de que esta enzima, diferente de tripsina em sua ação catalítica seja inibida pelo mesmo inibidor protéico que inibe a enzima proteolítica é facilmente com-

preensível quando se sabe que a quinase de proteína exige uma especificidade de seu substrato protéico semelhante aquela exigida por tripsina (164). Estes resultados são, pelo menos a nosso ver, os primeiros a indicarem que inibidores de tripsina típicos podem inibir outras enzimas bastante diferentes em suas atividades. É interessante notar que esta enzima está envolvida nos processos de amplificação intracelular de estímulos hormonais (165). Apesar destes processos não terem sido detectados em plantas superiores (166) parece haver indícios de que estejam envolvidos na germinação de um fungo unicelular (167).

Recentemente Youle e Huang (168, 153) e Tully e Beevers (169) mostraram a existência em sementes de mamona de uma fração protéica presente em corpos protéicos e que tem características muito próximas dos inibidores de tripsina de sementes; estas características incluem o peso molecular baixo, altas percentagens de cistina e aminoácidos ácidos. Apesar de Perrone e col. haverem constatado uma fraca atividade anti-triptica em torta de mamona (78a) isto parece não ter sido confirmado em nosso laboratório, por Carasco trabalhando com a semente livre de tegumento (154).

Ainda com relação aos inibidores de tripsina, um exame das Tabelas I e II mostra que essas substâncias estão distribuídas nas sementes, pelo menos em sementes de leguminosas, em concentrações que atingem uma variação de 5 décadas (de < 1 a $> 10^5$ UI/g). Esta enorme variação nas concentrações de inibidores não nos parece ser indicação razoável de sua função como inibidores de enzimas tipo tripsina. Esta idéia é bastante reforçada quando observamos que alguns cultivares de Phaseolus vulgaris, espécie bastante conhecida por seus inibidores de tripsina, não contêm inibidores (170).

As observações acima expostas nos levam à sugestão com a qual tentamos esclarecer a reformulação da pergunta posta no início destas conclusões, de qual seria o papel exercido pelos inibidores de tripsina nas plantas. Esta sugestão seria

a de que os inibidores de tripsina fazem parte de uma família de proteínas caracterizadas por possuírem baixo peso molecular (em torno de 10.000 daltons), ponto isoelétrico ácido, alto teor de cistina e aminoácidos ácidos, geralmente resistentes a ação do calor a baixos pHs e, bastante importante, extremamente resistentes a ação de enzimas proteolíticas, isto é, não são facilmente hidrolisadas enquanto tenham seus resíduos de cistina não reduzidos. Estas características, aliadas a existência de resíduos de aminoácidos com especificidade adequada, a nosso ver, é que tornam essas substâncias inibidores proteicos de enzimas proteolíticas e possivelmente de outras enzimas. Esta família de proteínas seria constituída, em algumas espécies, quase que integralmente de inibidores de tripsina, em outras espécies os inibidores de tripsina constituiriam uma fração praticamente desprezível (ver Tabela I). Em outras espécies ainda, talvez a maioria das leguminosas, a fração de inibidores se encontra entre estes dois extremos.

À luz do que foi exposto acima a pergunta inicialmente posta poderia ser formulada de outro modo: qual seria o papel ou papéis exercidos nas plantas por essas proteínas de baixo peso molecular, ricas em cistina e resistentes a proteólise?

Tendo em vista que durante nossos estudos, tanto com Vigna unguiculata como com outras espécies, tenhamos nos valido das atividades anti-triptica e anti-quimiotriptica como meio de seguir o comportamento dessas substâncias durante o desenvolvimento ontogenético (26) e durante a germinação(24,25) as generalizações que englobem essa classe de substâncias devem ser feitas com cautela.

Observações com V. unguiculata reforçam, embora fracamente, a sugestão de que os inibidores de tripsina ou inibidores específicos possam estar envolvidos no controle de enzimas proteolíticas endógenas (157). Esta também parece ser uma sugestão que é reforçada pelas experiências com os sistemas inibidor/proteinase de Artocarpus integrifolia (27) e Anacardium occidentale(92).

A presença de inibidores de azocaseinase e hemoglobina de larvas de Callosobruchus maculatus em preparações de V. unguiculata é uma sugestão da possível contribuição dessa classe de substâncias para o arsenal de defesa contra ataque de insetos (163).

Os estudos relacionados com o aparecimento da atividade anti-trípica em frutos de V. unguiculata, desenvolvidos por Carasco em nosso laboratório parecem apontar para um paralelismo entre os sistemas de síntese para inibidores e aqueles utilizados para síntese de proteínas de reserva (26). Nossos estudos sobre o comportamento dos inibidores de tripsina e quimiotripsina durante a germinação, por outro lado, parecem indicar que essas proteínas tem uma mobilização compatível com o tipo de mobilização característico das proteínas de reserva, apesar de haver diferenças temporais nos dois casos. Os inibidores parecem ter sua mobilização mais tardia do que as proteínas de reserva típicas (24,25). Isto poderia ser explicado pela sugestão apresentada por Ryan de que a degradação dos inibidores seria bastante limitada por suas características estruturais (171). O fato também de que os inibidores parecem ser sintetizados no epicótilo-plúmulas quando do estabelecimento da plântula (25) e o seu aparecimento em vagens durante o desenvolvimento do fruto, seguido do desaparecimento antes da maturação (26) parecem estar de acordo com aspecto de transitividade sugerido por Ryan para estas proteínas (17).

Apesar de não podermos apontar um papel definido para os inibidores de tripsina e muito menos para a classe de proteínas cuja existência é sugerida, algumas observações adicionais podem ser feitas. Qualquer que seja a função exercida por essas substâncias, tais como o controle da atividade de proteinases endógenas, proteção de proteínas quando de ruptura accidental da estrutura sub-celular, controle da atividade de enzimas não proteolíticas (e.g. quinase de proteínas), proteção contra ataque de insetos e microorganismos, mecanismo de dispersão de sementes, não deverá ser tomada como a única a

ser exercida na planta. Combinações de mais de uma dessas funções ocasionalmente ocorreriam em determinadas sementes.

Não podemos deixar de notar que a destinação final dessas substâncias, sejam inibidores de tripsina, sejam as proteínas constituintes desta classe caracterizada por uma estrutura rígida, proposta neste trabalho, parece ser a de fornecer aminoácidos principalmente cisteína(27) para síntese de novas proteínas. Torna-se, portanto, cada vez mais difícil aceitar esta função como sendo uma função secundária quando levamos em conta os altíssimos teores ora de inibidores de tripsina(até 26% da proteína solúvel em Adenantha pavonina) ora aqueles encontrados para proteínas aparentemente sem atividade enzimática mas nitidamente pertencentes à mesma classe (ca. de 40% de proteína total de Ricinus communis). (153).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) OSBORNE, T.B. and MENDEL, L.B. - The J.Biol.Chem. 32, 369 (1917) citado em PUSZTAI, A. - Nutrit. Abstracts Rev. 37, 1(1967)
- (2) READ, J.W. and HAAS, L.W. - Cereal Chem. 15, 59 (1938)
- (3) KUNITZ, M. - Science 101, 668 (1945)
- (4) KUNITZ, M. - J.Gen.Physiol. 30, 311(1947)
- (5) PUSZTAI, A. - Nutrit. Abstracts Rev. 37, 1 (1967)
- (6) BORCHERS, R., ACKERSON, C.W. and KIMMET, L. - Arch. Biochem. 13, 291 (1947)
- (7) LIENER, I.E. and KAKADE, M.L. - In I.E. LIENER (ed.) Toxic Constituents of Plant Foodstuffs (Academic Press, New York), 1969.
- (8) RICHARDSON, M. - Phytochemistry 16, 159(1977)
- (9) JAFFE, W.C., MORENO, R. and WALLIS, V. - Nutrit, Reports Internat. 7, 169(1973)
- (10) KASSEL, B. - Methods in Enzymol. 19, 839 (1970)
- (11) BIRK, Y. - Methods in Ezymol. 45(B), 695(1976)
- (12) LASKOWSKI, Jr., and SEALOCK, R.W. - The Enzymes (3rd. ed.) 3, 375 (1971)
- (13) LIENER, I.E. - In M.MILNER (ed.) Nutritional Improvement of Food Legumes by Breeding (John Wiley & Sons, New York), pp 307-309 (1975)
- (14) LIENER, I.E. - J. Food Science 41, 1076 (1976)
- (15) RYAN, D.S. and FEENEY, R.E. - In H. FRITZ, H. TSCHESCHE, L.J. GREENE and E. TRUSCHEIT(eds.) Proceedings of the 2nd. International Research Conference on Proteinase Inhibitors - Bayer Symposium IV (Springer-Verlag, Berlin), pp
- (16) VOGEL, R., TRAUTSCHOLD, I. and WERLE, E. - Natural Proteinase Inhibitors (Academic Press, New York), (1968)

- (17) RYAN, C.A. - Ann.Rev.Plant Physiol. 24, 173(1973)
- (18) MATILE,P. - Z.pflazenphysiol. 58, 365 (1968); citado em PUSZTAI, A. et al. New Phytol. 83, 371 (1979)
- (19) BAUMGARTNER,B. and CHRISPEELS,M.J. - Plant Physiol. 58, 1(1976).
- (20) MOSOLOV,V.V., LOGINOVA,M.D., FEDURKINA,N.V. and BENKEN, I.I. - Plant Sci.Letters 7, 77 (1976); citado em RICHARDSON, M - Phytochemistry 16, (1977)
- (21) MOSOLOV,V.V., LOGINOVA,M.D., MALOVA,E.L. and BENKEN,I.I. - Planta (Berl.)144, 265 (1979)
- (22) SHAINKIN,R. and BIRK,Y. - Biochim,Biophys,Acta 221, 502 (1970); citado em JAFFE,W.C., MORENO, R. and WALLIS, V. - Nutrit. Rports Internat. 7, 169 (1973)
- (23) DERBYSHIRE,E., WRIGHT,D.J. and BOULTER,D. - Phytochemistry 15, 3(1976)
- (24) XAVIER-FILHO, J. - Physiol. Plant. 28, 149 (1973)
- (25) XAVIER-FILHO, J. and NEGREIROS,A.N.M. - Z.Pflazenphysiol. 95, 423 (1979)
- (26) CARASCO,J.F. and XAVIER-FILHO,J. - Manuscrito submetido a publicação
- (27) PUSZTAI,A. - Planta (Berl.) 107, 121 (1972)
- (28) KIRSI,M. - Physiol. Plant. 32, 89 (1974)
- (29) KUNITZ, M. - J.Gen. Physiol. 30, 291 (1947)
- (30) CHAIRNEY, J. and TOMARELLI, R.M. - J. Biol.Chem. 171, 501 (1947)
- (31) GOAD, L.J. - PhD Thesi, University of Manchester (1963)
- (32) ERLANGER, B.E., KOKOWSKY, N. and COHEN, W. - Arch. Biochem. Biophys. 95, 271 (1961)
- (33) URIEL, J. and BERGES, J. - Nature (London)218, 578 (1968)
- (34) KAISER, K.- P. and BELITZ, H.-D. - Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 1, (1971)

- (35) XAVIER-FILHO, J. and SOUZA, F.D.N. - Biol. Plant. (Praha) 21, 119 (1979)
- (36) XAVIER-FILHO, J. and MOREIRA, R.A. - Anal. Biochem. 84, 296 (1978)
- (37) XAVIER-FILHO, J., LOPES, A.L.S., MOREIRA, R.A., PONTE, A.L.L. e AINOUZ, I.L. - Ciência e Cultura 30(7)Supl. 617 (1978)
- (38) DOMONT, G. - Comunicação pessoal
- (39) KAKADE, M.L., SIMONS, N. and LIENER, I.E. - Cereal Chem. 46, 518 (1969)
- (40) XAVIER-FILHO, J. - J. Food Science 39, 422 (1974)
- (41) MILLER, B.S. and JOHNSON, J.A. - Arch. Biochem. Biophys. 32, 200 (1951)
- (42) VENTURA, M.M. and XAVIER-FILHO, J. - An. Acad. Brasil. Cienc. 38, 553 (1966)
- (43) CHU, H. - M., LO, S.- S. and JEN, M.-H. - Scienc. Sinica (Pequim) 14, 1454 (1965); citado em I.E. LIENER (ed.) Toxic Constituents of Plant Protein Foodstuffs (Academic Press, New York), 1969
- (44) LASKOWSKI, M. and LASKOWSKI Jr., M. - Adv. Prot. Chem. 9, 203 (1969)
- (45) CLARKE, J.T. - Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 428 (1964)
- (46) XAVIER-FILHO, J. - Tese de Doutorado, Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1969.
- (47) AWDEH, Z.L., WILLIAMSON, A.R. and ASKONAS, B.A. - Nature (London) 219, 66 (1968)
- (48) WEBER, K. and OSBORN, M. - J. Biol. Chem. 244, 4406 (1964)
- (49) PORTER, W.H. and PRESTON, J.L. - Anal. Biochem. 66, (1975)
- (50) SVENSSON, H. - Acta Chem. Scand. 15, 325 (1961)
- (51) CHRAMBACH, A. and BAUMANN, G. - In N. CATSIMPOOLAS (ed.) Isoelectric Focusing (Academic Press, New York), pp 77-91 (1976)

- (52) WRIGLEY, C.W. - In N. CATSIMPOOLAS (ed.) Isoelectric Focusing (Academic Press, New York), pp 93-117(1976)
- (53) PETERSON, E.A. - In T.S. WORK and E. WORK (eds.) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (North - Holland Publishing Co., Amsterdam) Vol 2, pp 223-400(1970)
- (54) PHARMACIA FINE CHEMICALS - Catálogo 1980
- (55) PHARMACIA FINE CHEMICALS - Affinity Chromatography, Principles and Methods, 1979.
- (56) LOWE, C.R. and DEAN, P.D.G. - Affinity Chromatography (John Wiley & Sons, London), (1974)
- (57) KASSEL, B. and MARCINISZYN, M.B. - In H. FRITZ and H. TSCHESCHE (eds.) Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors (I)-Munich (Walter de Gruyter, Berlin), pp 43-46 (1971)
- (58) FEINSTEIN, G. - In H. FRITZ and H. TSCHESCHE (eds.) Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors (I) - Munich (Walter de Gruyter, Berlin), pp 38-42 (1971)
- (59) CECHOVA, D. - Collect. Czech. Chem. Commun. 39, 647 (1974)
- (60) XAVIER-FILHO, J. and RUSCHEL, M.A. - II PAABS Congress Abstract Book, pp 68 (1978)
- (61) FRITZ, H., BREY, J., MULLER, M. and GEBHARDT, M. - In H. FRITZ and H. TSCHESCHE (eds.) Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors (I) -Munich (Walter de Gruyter, Berlin), pp 28-37 (1971)
- (62) FOSTER, R.J. and RYAN, C.A. - Fed. Proc. 24, 473 (1965)
- (63) FEINSTEIN, G. and FEENEY, R.E. - J. Biol. Chem. 241, 5183 (1966)
- (64) FEINSTEIN, G., HOFFSTEIN, R. and SOKOLOWSKY, M. - In H. FRITZ, H. TSCHESCHE, L.J. GREENE and E. TRUSCHEIT (eds.) Proceedings of the 2nd. International Research Conference on Proteinase Inhibitors - Bayer Symposium IV (Springer-Verlag, Berlin), pp 199-212 (1974).

- (65) BOGARD, Jr., W.C. and LASKOWSKI, Jr., M. - Federation of American Societies for Experimental Biology, 63rd Annual Meeting, Abstracts of Papers, pp 836 (1979)
- (66) XAVIER-FILHO, J. - Relatório ao "Deutscher Akademischer Austausch Dienst", 1979.
- (67) AKO, H., FOSTER, R.J. and RYAN, C.A. - Biochem. Biophys. Research. Comm. 47, 1402 (1972)
- (68) FAHRNEY, D.E. and GOLD, A.M. - J. Amer. Chem. Soc. 85, 997 (1963)
- (69) SHAW, E., MARES-GUIA, M. and COHEN, W. - Biochemistry 4, 2219 (1965)
- (70) XAVIER-FILHO, J. e CAMPOS, F.A.P. - IX Reunião da SBBq-Caxambu, Livro de Resumos, G13 (1980)
- (71) HEYWOOD, V.H. - In J.B. HARBORNE, D. BOULTER and B.L. TURNER (eds.) Chemotaxonomy of the Leguminosae (Academic Press, London), pp 1-29 (1971)
- (72) STRASBURGER, E., NOLL, F., SCHENCK, H. y SCHIMPEM, A.F.W. - Tratado de Botanica, 4a. ed. espanhola (Manuel Marin & Cia., Barcelona), (1953)
- (73) HOLZER, H. - Proc. Austr. Biochem. Soc. 8, P3 (1975)
- (74) RICHARDSON, M. - Comunicação pessoal, 1979
- (75) XAVIER-FILHO, J. - Dados não publicados
- (76) FURUSAWA, Y. - Comunicação pessoal
- (77) OGAWA, T., HIGASA, T. and HATA, T. - Agr. Biol. Chem. 32, 484 (1968)
- (78) WEDER, J.K.P. - Z. Pflanzenphysiol. 90, 285 (1978)
- (78a) PERRONE, J.C., IACHAN, A., DOMONT, G.B., DISITZER, L.V., CASTRO, V.R.O., ROITMAN, R. e GOMES, S.M. - Contribuição ao Estudo da Torta de Mamona (Imprensa Nacional, Rio de Janeiro), (1966)
- (79) PINSKY, A. and SCHWIMMER, V.H. - Phytochemistry 13, 774 (1974)

- (80) UBATUBA, F.B. - Rev. Brasil. Biol. 15, 1 (1955)
- (81) LIENER, I.E. - Amer. J. Clin. Nutr. 11, 281 (1962)
- (82) YOSHIDA, C. and YOSHIKAWA, M. - J. Biochem. 78, 935 (1975)
- (83) SGARBIERI, V.C. - Ciencia e Cultura 32, 78 (1980)
- (84) SUBBULAKSHMI, G., GANESHKUMAR, K. and VENKATARAMAN, L.M. - Nutr. Reports Intern. 13, 19 (1976)
- (85) ABE, O., OHATA, J., UTSUMI, Y. and KUROMIZU, K. - J. Biochem. 83, 1737 (1978)
- (86) SUNBERG, L., PORATH, J. and ASPBERG, K. - Biochem. Biophys. Acta 221, 384 (1976)
- (87) JOUBERT, F.J., KRUGER, H., TOWNSHEND, G.S. and BOTES, D.P. - Eur. J. Biochem. 97, 85 (1979)
- (88) RYAN, C.A., KUO, T., PEARCE, G. and KINKEL, R. - Amer. Potato J. 53, 443 (1976)
- (89) BAILEY, R.N. - In J.B. HARBORNE, D. BOULTER and B.L. TURNER (eds.) Chemotaxonomy of the Leguminosae (Academic Press, London), pp 503-541 (1971)
- (90) MOREIRA, R.A. - "Projeto Sementes", apresentado a FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos), 1977.
- (91) SHAIN, Y. and MAYER, A.M. - Phytochemistry 7, 1491 (1968)
- (92) XAVIER-FILHO, J. and AINOZ, I.L. - Biol. Plantarum (Praha) 19, 183 (1977).
- (93) CASTRO, A. - A Cabra (Secretaria de Agricultura e Abastecimento, Fortaleza), pp 291 (1979)
- (94) CAMPOS, F.A.P. - Resultados não publicados.
- (95) VENTURA, M.M. and XAVIER-FILHO, J. - An. Acad. Brasil. Cienc. 36, 375R (1964)
- (96) VERDCOURT, B. - Kew Bull. 24, 507 (1970)
- (97) PROTEIN ADVISORY GROUP (PAG) Statement 22 - In M. MILNER (ed.) Nutritional Improvement of Food Legumes by Breeding

- (John Wiley & Sons. New York), pp 131-141 (1975)
- (98) MEINERS, J.P. and LITZENBERGER,S.C. - In M. MILNER (ed.) Nutritional Improvement of Food Legumes by Breeding (John Wiley & Sons,New York), pp 131-141 (1975)
- (99) RACHIE,K.O. - In M.MILNER (ed.) Nutritional Improvement of Food Legumes by Breeding (John Wiley & Sons, New York), pp 83-92 (1975)
- (100) PAIVA,J.B., SANTOS,J.H.R., OLIVEIRA,F.J. e TEOFILO.E.M. (Relatores) Seminário de Avaliação das Pesquisas Desenvolvidas no Estado do Ceará sob o Patrocínio da SUDENE; Programa de Pesquisa com a Cultura do Feijoeiro (Centro de Ciências Agrárias, UFC, Fortaleza), pp 1-31 (1977)
- (101) BLISS,F.A. - In M. MILNER (ed.) Nutritional Improvement of Food Legumes by Breeding (John Wiley & Sons, New York), pp 151-158(1975)
- (102) BOULTER,D., EVANS,I.M., THOMPSON, A. and YARWOOD,A. - In M.MILNER (ed.) Nutritional Improvement of Food Legumes by Breeding (John Wiley & Sons, New York), pp 205-215 (1975)
- (103) RACHIE,K.O. - In M.MILNER (ed.) Nutritional Improvement of Food Legumes by Breeding (John Wiley & Sons, New York), pp 173-176)1975)
- (105) JAFFÉ,W.C. - citado em I.E. LIENER - Amer. J.Clin. Nutrit. 11,281(1962)
- (106) CHATTOPADHYAY,H. and BANERJEE,S. - Ind.J.Med.Res.41, 185 (1953)
- (107) HONAVAR,P.M. and SOHONIE,K. - J.Univ.Bombay 24B, 64(1955)
- (108) SOHONIE,K. and BHANDARKAR,A.P. - J.Sci.Indust.Res. 13B, 500(1954)
- (109) SOHONIE,K. and BHANDARKAR,A.P. - J.Sci.Indust.Res. 14B, 100(1955)
- (110) BHATTY,R.S. - Can.J.Plant Sci. 54, 413(1974), citado em M.RICHARDSON - Phytochemistry 16, 159 (1977)

- (111) ROYER, A. - *Phytochemistry* 14, 915 (1975)
- (112) GENNIS, L.S. and CANTOR, C.R. - *The J. Biol. Chem.* 251, 734 (1976)
- (113) GATEHOUSE, A.M.R., GATEHOUSE, J.A., DOBIE, P., KILMINSTER, A.M. and BOUTLER, D. - *J. Sci. Food Agric.* 30, 948 (1979)
- (114) SPENCER, D. and HIGGINS, T.S.V. - *Curr. Adv. Plant Sci.* 11, 34.1 (1979)
- (115) BOULTER, D. and DERBYSHIRE, E. - In J.B. HARBORNE, D. BOULTER and B.L. TURNER (eds.) *Chemotaxonomy of the Leguminosae* (Academic Press, Londn), pp 285-308 (1971)
- (116) JONES, G., MOORE, S. and STEIN, W. - *Biochemistry* 2, 66 (1963)
- (117) ROYER, A., MIEGE, M.N., GRANGE, A., MIEGE, J. et MASCHERPA, J.M. - *Planta (Berl.)* 119, 1 (1974)
- (118) HWANG, D.L. - R., LIN, K. - T.L., YANG, W. and FOARD, F.E. - *Biochim. Biophys. Acta* 495, 369 (1977)
- (119) CHRISPEELS, M.J. and BAUMGARTNER, B. - *Plant Physiol.* 61, 617 (1978)
- (120) HOBDAV, S.M., THURMAN, D.A. and BARBER, D.J. - *Phytochemistry* 12, 1041 (1973)
- (121) VENTURA, M.M., XAVIER-FILHO, J., MOREIRA, R.A. AQUINO, A.M. and PINHEIRO, P.A. - *An. Acad. Brasil. Cienc.* 43, 233 (1971)
- (122) XAVIER-FILHO, J. and RUSCHEL, M.A. - Manuscrito submetido a publicação.
- (123) CANN, J.R., STIMPSON, D.I. and COX, D.J. - *Anal. Biochem.* 86, 34 (1978)
- (124) GENNIS, L.S. and CANTOR, C.R. - *The J. Biol. Chem.* 251, 741 (1976).
- (125) GENNIS, L.S. and CANTOR, C.R. - *The J. Biol. Chem.* 251, 747 (1976)
- (126) GENNIS, L.S. and CANTOR, C.R. - *The J. Biol. Chem.* 251, 754 (1976)

- (127) GENNIS,L.S. - The J.Biol. Chem. 251, 763(1976)
- (128) GENNIS,L.S. and CANTOR,C.R. - The J.Biol. Chem. 251, 769(1976)
- (129) GATEHOUSE,A.M.R. - PhD Thesis, University of Durham, Inglaterra (1979)
- (130) VENTURA,M.M., MARTIN, C.O. and MORHY,L. - An:Acad.Brasil. Cienc. 47, 335 (1975)
- (131) FENFEY,R.E., MEANS,G.E. and BIGLER,J.C. - The J.Biol. Chem. 244, 1957 (1969)
- (132) LIENER,I.E. - J.Amer.Oil Chemists' Soc. 56, 121 (1979)
- (133) BEWLEY,J.D. and BLACK,M. - Physiology and biochemistry of Seeds in Relation to Germination, Vol 1 (Springer-Verlag, Berlin), 1978
- (134) KIRSI,M. and MIKOLA,J. - Planta(Berl.) 96, 281(1971)
- (135) RYAN,C.A., HUISMAN,O.C. and VANDENBURGH,R.W. - Plant Physiol. 43, 589 (1968)
- (136) KIRSI,M. and MIKOLA,J. - Physiol. Plant. 39, 110 (1977)
- (137) AMBE,K.S. and SOHONIE,K. - Experientia 12, 302 (1956)
- (138) AMBE,K.S. and SOHONIE,K. - J.Sci.Indust.Res. 15C, 136 (1956)
- (139) BIRK,Y. and WALDMAN,M. - Qual.Plant.Materialis Vegetabilis 12, 199 (1965)
- (140) MAIA,G.M.C. - Resultados não publicados
- (141) PERNOLLET,J.C.- Phytochemistry 17, 1473 (1978)
- (142) HARRIS,N. and BOULTER,D. - Ann. Bot. 40, 739 (1976)
- (143) MIEGE,M.- N. and MASCHERPA,J. - M. - Physiol. Plant. 37, 229 (1976)
- (144) CRAIG,S., GOODCHILD,D.J. and HARDHAM,A.R. - Austr. J. Plant Physiol. 6, 81 (1979)
- (145) MLODZIANOWSKI,F. - Z.Pflanzenphysiol. 86, 1(1978)

- (146) MIÉGE, M.-N., MASCHERPA, J.-M., ROYER-SPIERER, A., GRANGE, A. et MIÉGE, J. - *Planta*(Berl.) 131, 81 (1976)
- (147) PUSZTAI, A., CROY, R.R.D., GRANT, G. and WATT, W.B. - *New Phytol.* 79, 61 (1977).
- (148) KOROLEVA, T.N., ALEKSEEVA, M.V., SHUTOV, A.D. and VAINTRAUB, I.A. - *Soviet Plant Physiol.* 20, 650 (1973)
- (149) SOUZA, F.D.N. - Resultados não publicados
- (150) LIENER, I.E. - In M.MILNER (ed.) *Nutritional Improvement of Food Legumes by Breeding* (John Wiley & Sons, New York), pp 239-258 (1975)
- (151) PUSZTAI, A., CROY, R.R.D. and GRANT, G. - *Abhandl. Akad. Wissenschaften DDR* N4, 133(1978)
- (152) BAIN, J.M. and MERCER, F.V. - *Austr. J. Biol. Sci.* 19, 49 (1966), citado em N.HARRIS and BOULTER, D. - *Ann. Bot.* 40, 739 (1976)
- (153) YOULE, R.J. and HUANG, A.H.C. - *Plant Physiol.* 61, 13 (1978)
- (154) CARASCO, J.F. - Resultados não publicados
- (155) KIRSI, M. - *Physiol. Plant.* 29, 141 (1973)
- (156) SHAIN, Y. and MAYER, A.M. - *Physiol. Plant.* 18, 853 (1965)
- (157) XAVIER-FILHO, J., GOMES-FILHO, E. e AINOUZ, I.L. - *Ciência e Cultura* 24(6)Supl. 103 (1972)
- (158) GHETIE, V. - *Rev. Roum. Biochim.* 3, 353(1966)
- (159) HATCH, M.D. and TURNER, J.F. - *Biochem. J.* 76, 556(1960)
- (160) COSTA, J.J.M. e XAVIER-FILHO, J. - *Ciência e Cultura* 25 (6)Supl., 141(1973)
- (161) XAVIER-FILHO, J. - *Ciência e Cultura* 29(7)Supl., 565 (1977)
- (162) CHRISPEELS, M.J. and BOULTER, D. - *Plant Physiol.* 55, 1031 (1975)
- (163) XAVIER-FILHO, J. and COELHO, A.N. - *Plant Physiol.*

- (164) ALHANATY, E., BASHAN, N., MOSES, S. and SHALTIEL, S. - Eur. J. Biochem. 101, 283 (1979)
- (165) CHEUNG, W. Y. - Science 207, 19 (1980)
- (166) TAO, K. L. and KHAN, A. A. - In A. A. KHAN (ed.) The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination (North-Holland Publ. Co., Amsterdam). pp 413-433 (1977)
- (167) MAIA, J. C. C., GOMES, S. L., MENNUCCI, L., JULIANI, M. H., BROCHETTO, M. R. and CERON, C. R. - IX Reunião da SBBq-Caxambu, Livro de Resumos, pp 66-67 (1980)
- (168) YOULE, R. J. and HUANG, A. H. C. - Plant Physiol. 58, 703 (1976)
- (169) TULLY, R. E. and BEEVERS, H. - Plant Physiol. 58, 710 (1976)
- (170) JAFFÉ, W. C. - Nutritional Aspects of Common Beans and other Legume Seeds as Animal and Human Foods, pp 199-209.
- (171) GUSTAFSON, G. and RYAN, C. A. - The J. Biol. Chem. 251, 7004 (1976)