

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA FRAÇÃO PROTÉICA DE
Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. Seridó RESISTENTE AO CALOR,
A pH ÁCIDO E RICA EM INIBIDORES DE TRIPSINA.

MARÍLIA LOPES BRANDÃO

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA,
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - 1985

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

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

Marília Lopes Brandão

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/02/85

José Xavier Filho
Orientador da Dissertação

Iracema Lima Ainoz

Renato de Azevedo Moreira

Ao Paulo e
a meus pais.

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de bolsa de Pós-Graduação concedida à autora e de auxílios ao curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), através de auxílios ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

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

AGRADECIMENTOS

Ao professor José Xavier Filho pela orientação segura e dedicada.

Aos professores Iracema Lima Ainouz e Renato de Azevedo Moreira pelas sugestões e contribuições valiosas durante a realização desta dissertação.

Ao professor Francisco de Assis de Paiva Campos pelas ricas e estimulantes discussões.

Aos demais professores, colegas e funcionários pelos ensinamentos, cooperação e amizade.

2.2.8.3.1 - Atividade da FRC sobre a Atividade da Pepsina	22
2.2.8.4 - Atividade da Subtilisina BPN'	22
2.2.8.4.1 - Ação da FRC sobre a Atividade da Subtilisina BPN'	23
2.2.8.5 - Atividade da Papaína	23
2.2.8.5.1 - Ação da FRC sobre a Atividade da Papaína.	24
2.2.8.6 - Atividade da Pronase	24
2.2.8.6.1 - Ação da FRC sobre a Atividade da Pronase.	25
2.2.8.7 - Atividade Azo-caseinásica Ácida de Extrato de C. maculatus	25
2.2.8.7.1 - Ação da FRC sobre a Atividade Azo-caseinásica Ácida de Extrato de Callosobruchus maculatus	26
2.2.8.8 - Atividade Azo-caseinásica Alcalina de Extrato de C. maculatus	26
2.2.8.8.1 - Ação da FRC sobre a Atividade Azo-caseinásica Alcalina de C. maculatus	26
2.2.8.9 - Atividade Caseinásica da Fração 25/50	27
2.2.8.9.1 - Ação da FRC sobre a Atividade Caseinásica da Fração 25/50	27
2.2.8.10 - Atividade BAPA-ásica da F 25/50	28
2.2.8.10.1 - Ação da FRC sobre a Atividade BAPA-ásica da F 25/50	28
2.2.8.11 - Atividade Hemoglobínica da Fração 25/50.	29
2.2.8.11.1 - Ação do FRC sobre a Atividade Hemoglobínica da F 25/50	29
2.2.9 - Cromatografia em Sephadex G 100	30
2.2.10 - Cromatografia de Troca Iônica	30
2.2.11 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida a pH 8.1 .	31
2.2.12 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS	32
2.2.13 - Focalização isoelétrica em Placas de Gel de Poliacrilamida	32
3 - <u>RESULTADOS</u>	34
3.1 - <u>Determinação de Nitrogênio Total</u>	34
3.2 - <u>Determinação de Carboidrato</u>	34
3.3 - <u>Ação da FRC sobre as Atividades Proteolíticas Estudadas</u>	34

3.3.1 - Ação da FRC sobre a Atividade da Tripsina <u>Bo</u> <u>vina</u>	34
3.3.2 - Ação da FRC sobre a Atividade da Tripsina <u>Por</u> <u>cina</u>	36
3.3.3 - Ação da FRC sobre a Atividade da Quimiotripsi na Bovina	36
3.3.4 - Ação da FRC sobre a atividade da Pepsina	36
3.3.5 - Ação da FRC sobre a Atividade da Pronase	36
3.3.6 - Ação da FRC sobre a Atividade da Subtilisina BPN'	40
3.3.7 - Ação da FRC sobre a Atividade Proteínásica da Papaína	40
3.3.8 - Ação da FRC sobre as Atividades Azo-caseinási cas de Extrato Bruto de C. maculatus	40
3.3.9 - Ação da FRC sobre a Atividade Caseinásica da Fração 25/50 de Vigna unguiculata	41
3.3.10 - Ação da FRC sobre a Atividade BAPA-ásica da F 25/50 de Vigna unguiculata	41
3.3.11 - Ação da FRC sobre a Atividade Hemoglobínási ca da Fração 25/50 de Vigna unguiculata	42
3.4 - <u>Caracterização da FRC por Métodos Eletroforéti</u> <u>cos</u>	42
3.4.1 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida a pH 8.1	42
3.4.2 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS.	42
3.5 - <u>Caracterização da FRC por Métodos Cromatográfi</u> <u>cos</u>	48
3.5.1 - Cromatografia em Sephadex G 100	48
3.5.2 - Cromatografia de Troca Iônica em DEAE-Celulose.	48
3.6 - <u>Eletrofocalização em Gel de Poliacrilamida</u>	53
4 - <u>DISCUSSÃO</u>	56
5 - <u>CONCLUSÕES</u>	62
6 - <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	63

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Esquema de obtenção da FRC	16
2	Atividade anti-triptica da FRC, utilizando-se tripsina bovina	35
3	Atividade anti-triptica da FRC, utilizando-se tripsina porcina	37
4	Atividade anti-quimiotriptica da FRC	38
5	Eletroforese em gel de poliacrilamida revelada por coramento negativo para inibidores de tripsina	43
6	Eletroforese em gel de poliacrilamida de uma amostra de FRC corada por negro de amido	44
7	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS de uma amostra de FRC. Coramento por Coomassie Blue	45
8	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS de uma amostra de FRC. Coramento negativo revelação para inibidores de tripsina	46
9	Perfil de eluição da cromatografia em Sephadex G 100, tampão fosfato	49
10	Perfil de eluição da cromatografia em Sephadex G 100, tampão acetato	50
11	Perfil de eluição de uma cromatografia em DEAE-celulose da FRC	52
12	Eletrofocalização em placas de gel de poliacrilamida da FRC. Revelação para inibidores de tripsina	54

FIGURA

Página

- 13 Eletrofocalização em placas de gel de poliacrilamida da FRC. Revelação para proteínas .. 55

LISTA DE TABELAS

TABELAS

Página

1	Atividades residuais da pepsina, pronase, subtilisina BPN', papaína, azo-caseinases ácida e alcalina de C. maculatus e caseinase, hemoglobinase e BAPA-ase da F 25/50 de Vigna unguiculata	39
2	Pesos moleculares das bandas de proteína da FRC obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS	47
3	Pesos moleculares de frações S ₁ , S ₂ , S ₃ , S ₄ , S ₅ e S ₆ , eluídas por cromatografia em Sephadex G 100	51

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

APNE	acetil-DL-fenilalanina- β -naftil ester
ASD	ácido sulfanflico diazotizado
BAPA	α -N-Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida
DEAE	dietilaminoetil
DMS	dimetil sulfóxido
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético; sal dissódio
FRC	fração resistente ao calor
F 25/50	fração isolada de Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. Seridó no intervalo de 25 a 50% de saturação com sulfeto de amônio
I	inibidor
PM	peso molecular
QT	quimiotripsina
SDS	dodecil sulfato de sódio
S ₁ , S ₂ , S ₃ , S ₄ , S ₅ , S ₆	frações da FRC separadas por filtração em gel de Sephadex G 100
T	tripsina
TCA	ácido tricloro acético
TF	tampão fosfato
UI	unidades de inibidor

RESUMO

Uma fração protéica isolada de sementes quiescentes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Seridó, resistente ao calor e solúvel em ácido, foi parcialmente caracterizada nesse trabalho. Os testes de inibição da atividade proteolítica de algumas proteinases pela fração em estudo, mostraram que a Fração Resistente ao Calor (FRC) inibe tripsina bovina, tripsina porcina, quimiotripsina e pronase. Esta última, muito fracamente. Entretanto, a FRC não foi capaz de, nas condições de ensaio, inibir as atividades proteinásicas das seguintes enzimas: subtilisina BPN¹, Pepsina, Papaína, Azo-caseinase ácida e alcalina de *Callosobruchus maculatus* e as atividades BAPA-ásica, caseinásica e hemoglobínica da Fração 25/50 isolada de *Vigna unguiculata* cv. Seridó.

Algumas características da FRC foram examinadas por filtração em gel de Sephadex G 100, eletroforese em gel de poliacrilamida, cromatografia em DEAE-celulose e focalização isoelétrica em placas de gel de poliacrilamida.

Os pesos molecular aparentes das proteínas constituintes da FRC, determinados por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, variam de 8.000 a 49.000 daltons.

Estes valores de peso molecular foram muito baixos quando comparados com os obtidos por filtração em gel de Sephadex G 100, indicando assim a existência de agregados protéicos não estáveis em solução, na concentração do experimento.

A FRC quando examinada por focalização isoelétrica se apresenta heterogênea mostrando 17 bandas de proteína com pontos isoelétricos variando entre 3,2 a 5,3. Os inibidores de tripsina revelados por focalização isoelétrica constituem uma família de quatro inibidores com pontos isoelétricos de 5,3; 5,0; 4,7 e 4,1. O perfil da DEAE-celulose da FRC refletiu a grande complexidade da fração e a grande variedade de pontos isoelétricos.

ABSTRACT

A heat stable and acid soluble protein fraction (FRC) from quiescent seeds of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. was isolated and partially characterized. The inhibitory activity of this fraction towards some proteinases was tested. The FRC inhibited the proteolytic activity of bovine trypsin, porcine trypsin, chymotrypsin and pronase. However, within the assay conditions, the FRC failed to inhibit the proteolytic activity of subtilisin BPN', pepsin, papain, an acid and alkaline azo-caseinase activity found in larvae of the beetle *Calosobruchus maculatus*, and the BAPA-ase, caseinase and hemoglobinase activities isolated from *V. unguiculata* cv. Seridó seeds.

Some characteristics of the FRC were examined by gel filtration in Sephadex G 100, polyacrylamide gel electrophoresis, ion exchange chromatography and isoelectric focusing in polyacrylamide gel.

The apparent molecular weights of the protein components of the FRC were examined by PAGE-SDS, and ranged from 8.000 to 49.000 daltons. These values were very low when compared with the ones obtained by gel filtration in Sephadex G 100, indicating the existence of protein aggregates within the FRC, which are not stable in SDS solutions.

The DEAE-cellulose pattern of the FRC reflected the great complexity of this fraction. When examined by isoelectric focusing, the FRC was shown to be heterogeneous; 17 protein bands were visible in the gel and the isoelectric points ranged from 5.3 to 3.2. When gels were stained for trypsin inhibitors, four inhibitor bands were obtained, with isoelectric points of 5.3, 5.0, 4.7 and 4.1.

1 - INTRODUÇÃO

A carência de proteínas para alimentação humana nos países subdesenvolvidos tem motivado pesquisas sobre a natureza das proteínas de plantas. Estima-se que no ano 2000 a população mundial será de aproximadamente seis bilhões e que para alimentar essa população, mantendo-se as mesmas condições atuais de nutrição, será necessário duplicar o suprimento de proteínas vegetais e quadruplicar o de proteínas animais. Como isto é pouco provável, principalmente no tocante ao fornecimento de proteínas de origem animal, as proteínas vegetais passam a desempenhar um papel de grande importância como fonte de alimento. Aliás, em muitos países pobres, as proteínas de plantas já constituem a principal fonte de proteínas na dieta das populações menos favorecidas (KAKADE, 1974).

O alto conteúdo protéico, aproximadamente 25% do peso seco das sementes de leguminosas, particularmente, sementes de soja, feijão, amendoim e ervilha tornam estas plantas muito importantes do ponto de vista nutricional.

1.1 - Proteínas de Sementes - Aspectos Gerais

As proteínas de sementes, de um modo geral, podem ser classificadas em duas categorias: proteínas de reserva e proteínas envolvidas no metabolismo normal da célula. A maior parte das proteínas de sementes é constituída de proteínas de reserva. A fração de proteínas envolvidas no metabolismo normal da célula é relativamente pequena mas muito numerosa em tipos de proteínas (HIGGINS, 1984).

Ao longo do desenvolvimento das sementes as proteínas de reserva vão sendo acumuladas em quantidades signifi-

cantes. Durante a germinação essas proteínas estocadas vão sendo mobilizadas para fornecimento de nitrogênio reduzido que irá suprir o próprio processo germinativo.

As proteínas, particularmente as de reserva, podem, por razões operacionais, ser separadas em quatro classes, de acordo com a solubilidade: albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas que são solúveis respectivamente em água, solução salina, álcool e soluções levemente ácidas ou básicas. As globulinas representam as principais proteínas de reserva dos legumes, e dicotiledôneas de um modo geral. Por outro lado, cereais como o milho, trigo, cevada são ricos em prolaminas e glutelinas. Estas proteínas constituem portanto, a principal forma de armazenamento protéico das monocotiledôneas. É oportuno salientar que na aveia, embora uma monocotiledônea, as principais proteínas de reserva são da classe das globulinas (RYAN, 1973 & HIGGINS, 1984).

A composição de aminoácidos das proteínas de reserva, de certo modo, é consistente com o papel de reserva de nitrogênio atribuído a essas proteínas. Elas são ricas em asparagina, glutamina, arginina e prolina.

Os legumes normalmente apresentam baixos níveis de cisteína, metionina e triptofano. Já nos cereais, os aminoácidos que se apresentam em níveis muito reduzidos são a lisina, treonina e triptofano (HIGGINS, 1984).

Freqüentemente, as globulinas de reserva de legumes estão presentes como proteínas oligoméricas. As frações prolamínicas dos cereais estão presentes na forma de monômeros ou pequenos agregados e são solúveis em álcool a 70% enquanto as frações glutelínicas também características dos cereais, formam grandes agregados ligados por pontes dissulfeto, e são solúveis em ácidos e bases.

Além do critério de solubilidade, as proteínas também podem ser classificadas tomando-se por base suas possíveis funções, já que elas podem atuar como enzimas, como elementos estruturais, como proteínas de reserva de vários tecidos, ou proteínas de defesa, etc. Esta classificação se mostra satisfatória desde que as proteínas estudadas tenham fun

ções definidas. Todavia existem algumas proteínas de plantas para as quais o papel fisiológico não foi determinado. Geralmente, nesses casos, muitos papéis biológicos são propostos e especulados, tomando-se por base algumas propriedades bioquímicas dessas proteínas. No entanto, sabe-se que as propriedades bioquímicas de uma proteína podem não ser expressas na natureza e portanto serem insuficientes para explicar o significado fisiológico dessa proteína na planta (ADAMS, 1981). LASKOWSKI & KATO (1980) reforçaram essa idéia quando afirmaram que a maioria dos inibidores de proteases foi descoberta e isolada usando-se como indicador a sua capacidade de inibir enzimas proteolíticas disponíveis (como tripsina bovina). Na verdade, em virtude disso, os inibidores tornaram-se proteínas em busca de uma função, mais do que proteínas isoladas com o intuito de explicar uma função biológica previamente descoberta.

Alguns pesquisadores sugeriram que os inibidores de proteinases e outras proteínas vegetais cuja função biológica não é aparente, tais como urease, α -amilase, lectinas e algumas proteases, podem ser classificadas como "proteínas disponíveis" em contraposição às "proteínas indispensáveis" tais como enzimas da via glicolítica, enzimas ribossomais, citocromos (ADAMS, 1981). O caráter de dispensabilidade é, portanto, o critério básico dessa nova proposta de classificação e envolve a idéia de que, como algumas plantas podem sobreviver sem as "proteínas dispensáveis", provavelmente o papel biológico dessas proteínas seria inespecífico e de certa forma passível de ser substituído por outras proteínas em outras espécies de plantas (XAVIER FILHO & CAMPOS, 1984).

Na classe destas proteínas dispensáveis, cujas funções biológicas ainda não foram claramente elucidadas, os inibidores naturais de proteases ocupam um lugar de destaque, posto que a compreensão dos mecanismos de controle das enzimas muito provavelmente possibilitará a manipulação de diversos processos biológicos.

1.2 - Inibidores de Proteinases

1.2.1 - Aspectos Gerais

Inibidores naturais de proteinases são proteínas que estão presentes na maioria das formas de vida. Eles apresentam a peculiar propriedade de se associar com enzimas proteolíticas formando complexos estequiometricamente definidos, nos quais a atividade catalítica das enzimas é competitivamente inibida. Tais inibidores são altamente específicos prestando-se portanto como ótimos sistemas de estudo das interações entre proteínas.

O interesse pelos inibidores foi inicialmente motivado pelo seu provável significado nutricional. A presença destas proteínas em leguminosas, Gramíneas e Solanáceas contribui para diminuir o valor nutritivo desses alimentos. Observou-se que a presença dos inibidores de tripsina na dieta de animais de laboratório provocava um retardamento no crescimento e uma hipertrofia pancreática, o que podia ser evitado pela prévia inativação dos inibidores pelo calor ou outro agente desnaturante (LIENER & KAKADE, 1980). O grande número de espécies dessas famílias e seu importante significado econômico leva ainda hoje a que se concentrem nelas os estudos sobre inibidores naturais de enzimas proteolíticas. Entretanto estas proteínas estão amplamente distribuídas no reino vegetal, embora sua presença varie quantitativamente entre as várias espécies do mesmo gênero e até entre variedades de uma mesma espécie. Algumas cultivares de *Phaseolus vulgaris*, espécie bastante conhecida pelos seus inibidores de tripsina, não contêm inibidores (JAFFÉ et al., 1973), o que poderia reforçar o caráter de dispensabilidade dessas substâncias, atribuído por alguns pesquisadores (ADAMS, 1981).

A maioria dos inibidores de proteinases de origem vegetal compartilha algumas propriedades comuns. Geralmente contêm altas percentagens de resíduos de cisteína, presentes

como pontes dissulfeto, o que provavelmente lhes confere uma grande resistência a agentes desnaturantes, tais como calor, extremos de pH, etc. e grande estabilidade face ao ataque de enzimas proteolíticas. Entretanto, outras interações não covalentes são também responsáveis pela estabilidade dos inibidores, como foi demonstrado para o inibidor I de batatas que, apesar de possuir apenas uma ponte dissulfeto resiste a temperatura de 80°C (RYAN, 1981).

A tolerância a condições desnaturantes é pois uma característica própria dos inibidores de enzimas proteolíticas, o que não se aplica à grande maioria das proteínas. O inibidor de soja de Bowman-Birk, por exemplo, permanece estável após tratamento com etanol a 90°C. O inibidor de "lima bean" (*Phaseolus lunatus*) continua ativo após aquecimento a 90°C por 15 minutos. Este mesmo inibidor é capaz de resistir ao tratamento com HCl 0,01 N a 40°C por duas horas e, quando tratado com NaOH 0,1 N, a 23°C por 24 horas, ainda mantém sua atividade inibitória (ADAMS, 1981).

Os inibidores geralmente são pobres em metionina, histidina e triptofano. Entretanto muitos são ricos em ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina e resíduos de serina (RYAN, 1981).

Os inibidores de proteinases de plantas em geral apresentam pequenos pesos moleculares (entre 4.000 e 60.000 daltons, freqüentemente entre 8.000 . 20.000 daltons). Quando apresentam peso molecular elevado são proteínas poliméricas cujos protômeros têm PM em torno de 10.000 daltons.

A associação dos inibidores com suas respectivas proteinases é um processo dependente de pH e usualmente é forte a pH neutro, decrescendo à medida que o pH se aproxima de 3,0.

Estudos do sistema inibidor-enzima, particularmente dos inibidores de tripsina, levaram LASKOWSKI & KATO (1980) a sugerir que a formação do complexo se devia à ação da enzima sobre uma ligação peptídica específica da molécula do inibidor, formando uma acil-enzima acompanhada da hidrólise da ligação peptídica. FOSTER E RYAN, citados em LASKOWSKI & KATO

(1980), mostraram que quimiotripsina inativa e inibidor de batata formam complexos estáveis. Portanto nem a resistência nem a suscetibilidade à hidrólise do sítio reativo são fatores de fundamental importância no mecanismo de inibição.

É importante salientar que os estudos sobre mecanismos de inibição referem-se principalmente aos inibidores de proteinases tipo serina. Apesar de já terem sido isolados e descritos inibidores de carboxiproteinases, metaloproteinases e sulfidrilproteinases, eles permanecem relativamente pouco estudados. Essa preferência pelos inibidores de proteinase tipo serina se deve, provavelmente, ao fato de que os laboratórios e pesquisadores pioneiros usavam tripsina bovina ou quimiotripsina como enzima teste. Portanto, isso não reflete uma ocorrência mais ampla desses inibidores na natureza (LASKOWSKI & KATO, 1980).

Os sistemas inibidor-enzima analisados por cristalografia de raios-X mostram que os inibidores são ótimos substratos que se ligam ao sítio reativo da enzima de modo a bloqueá-lo. O contato ocorre numa pequena região da enzima e do inibidor, de modo que numerosas interações são estabelecidas resultando num ajuste excelente. Uma característica notável desses inibidores é a presença de pelo menos uma ponte dissulfeto envolvendo a ligação peptídica do sítio reativo. Isso garantiria a não dissociação das cadeias polipeptídicas quando da conversão da forma virgem para a forma modificada do inibidor. Todavia, já há evidências de que ligantes não covalentes possam exercer o papel de pontes dissulfeto, no sentido de manter a associação das cadeias polipeptídicas do inibidor (LASKOWSKI & KATO, 1980).

Os inibidores naturais de proteinases podem ser classificados em famílias, onde o critério de classificação é a homologia entre seus membros, principalmente nas relações topológicas entre as pontes dissulfeto e a localização do sítio reativo. Os inibidores da família de Bowman-Birk, por exemplo, possuem duas regiões homólogas, cada uma com sítio reativo numa posição homóloga. Trata-se de típicos inibidores de dupla cabeça. Estes inibidores são capazes de inibir

duas ou mais enzimas simultaneamente, isto é, uma só molécula inibidora pode inibir várias enzimas de forma independente. A associação de várias cadeias polipeptídicas, cada uma com um sítio reativo, é comumente responsável pela formação dos inibidores de múltiplas cabeças (LASKOWSKI & KATO, 1980).

Muitos inibidores já foram descritos, inclusive inibidores de proteinases tipo serina que também mostram atividade contra uma protease sulfidrídica. Esse é o caso do inibidor de tripsina e quimiotripsina de "broad bean" (**Vicia faba**) que também inibe papaína. O inibidor de tripsina de soja (Kunitz) também inibe clostripaína (RICHARDSON, 1977).

Recentemente, CAMPOS & RICHARDSON (1983) determinaram a estrutura primária de um inibidor extraído de ragi (**Eleusine coracana**), que é capaz de inibir enzimas de classes diferentes. Esse inibidor é ativo contra tripsina e α -amilase, apresentando uma homologia estrutural não somente com o inibidor de α -amilase de trigo, mas também com os inibidores de tripsina de cevada e de milho.

1.2.2 - Papel Biológico dos Inibidores

Muitas pesquisas têm sido realizadas buscando determinar um papel biológico para os inibidores naturais de proteinases em plantas. Algumas especulações ainda que sugestivas requerem evidências suficientes. As dificuldades na determinação do significado fisiológico dessas proteínas nas plantas parecem sugerir a possibilidade dos inibidores exercerem uma multiplicidade de papéis. Entre as funções biológicas sugeridas para os inibidores, podemos incluir o envolvimento nos mecanismos de defesa e nos processos de regulação metabólica e como proteína de reserva.

1.2.2.1 - Regulação da Atividade de Proteinases Endógenas

Algumas evidências apontam para um papel de controle da atividade de proteinases endógenas, entretanto, na grande maioria dos casos, os inibidores têm mostrado atividade somente contra proteinases digestivas de animais e microrganismos, com especificidade para tripsina e quimiotripsina. Contudo, em algumas sementes com alface, cevada, arroz, centeio, batata e feijão de corda foi demonstrada a presença de inibidores capazes de inibir proteinases endógenas (RICHARDSON, 1977). Postula-se que a função desses inibidores estaria relacionada com a manutenção das enzimas proteolíticas em estado inativo nos órgãos quiescentes. Durante o processo germinativo da semente ocorreria a dissociação do complexo enzima-inibidor. As enzimas seriam envolvidas na mobilização de reservas de proteínas enquanto a concentração de inibidores decresceria rapidamente.

Mesmo que sugestiva essa hipótese é muito passível de críticas, tendo em vista que a grande maioria dos inibidores não é capaz de inibir proteinases endógenas e nenhum inibidor de proteinase, que está presente em grande quantidade em sementes ou em tubérculos, parece ter uma função de regulação de proteínas endógenas (RYAN, 1979). A inexistência de proteinases endógenas capazes de serem inibidas por inibidores isolados do mesmo tecido parece ser uma sugestão de que os inibidores não teriam um papel biológico relevante enquanto inibidores (XAVIER FILHO & CAMPOS, 1984).

1.2.2.2 - Proteção contra a Disrupção Acidental da Estrutura Subcelular

BAUMGARTNER & CHRISPEEL (1976) sugeriram um papel de proteção contra a disrupção acidental da estrutura subcelular. Este papel estaria relacionado com a defesa das protef-

nas citoplasmáticas contra uma possível disrupção dos deposi
tários de enzimas hidrolíticas em vegetais. Entretanto, são
poucas as indicações que apontam para esse papel, principal-
mente porque não foi confirmada uma localização exclusivamen-
te citoplasmática para os inibidores naturais de proteinases.

1.2.2.3 - Proteção contra o Ataque de Insetos e Microorganismos

Uma sugestão muito atrativa e interessante é a parti
cipação dos inibidores de proteinases nos processos de defe-
sa da planta contra o ataque de microorganismos, insetos, etc.
RYAN e colaboradores encontraram indicações desse papel tra-
balhando com folhas de tomateiro, que quando submetidas ao
ataque de insetos ou mesmo injúrias mecânicas produziam um
fator que induzia a liberação de inibidores de proteinases
(PIIF - "proteinase inhibitor inducing factor"). Posterior-
mente, esses investigadores demonstraram esse fenômeno em um
número significativo de plantas (RYAN, 1973). Outra evidên-
cia relatada por PENG & BLACK (citados por LIENER & KAKADE,
1980) consistiu no aumento da atividade inibitória em plan-
tas de tomate à medida que crescia uma infecção provocada
por fungos patogênicos.

Essa hipótese recebeu considerável suporte quando da
descoberta de um cultivar de feijão de corda resistente ao
ataque do gorgulho (*Callosobruchus maculatus*) e portador de
um alto conteúdo de inibidores de tripsina. Esta resistência
foi atribuída à ação dos inibidores já que outras cultivares
suscetíveis ao ataque do inseto não apresentavam alta concen-
tração de inibidores (GATEHOUSE, 1979). Entretanto, já foi
encontrada uma variedade de feijão de corda (*Vigna unguicu-*
lata) que, apesar de possuir o mesmo teor de inibidores pre-
sentes neste cultivar resistente ao gorgulho, é suscetível
ao ataque por este inseto (LOPES, 1985).

O papel biológico dos inibidores na proteção contra

insetos e outros invasores da planta envolve o estudo das interações aleloquímicas entre esses elementos. A digestão das proteínas de planta, seria portanto considerada como um fator de seleção do hospedeiro (RYAN, 1981).

1.2.2.4 - Proteção de Sementes no Mecanismo de Dispersão

Os inibidores naturais de proteínases podem estar relacionados com a proteção das sementes durante a passagem através do trato digestivo de alguns animais que excretam sementes viáveis (RICHARDSON, 1977). Esse papel biológico permanece no campo das especulações enquanto não surgirem evidências experimentais que o apoiem.

1.2.2.5 - Proteínas de Reserva

O papel de proteína de reserva para os inibidores é largamente favorecido quando se sabe que essas proteínas estão em grandes concentrações nas sementes e tubérculos, representando cerca de 6% em soja e 10% da proteína solúvel em grãos de cevada. Sementes de **Adenantha pavonina** possuem um quarto de sua proteína solúvel sob a forma de inibidores de tripsina (MAIA, 1982).

Como os inibidores geralmente apresentam alto conteúdo de aminoácidos sulfurados, eles poderiam funcionar como uma reserva especial, tanto de nitrogênio como de enxofre (PUSZTAI, 1967).

Em algumas plantas estudadas, particularmente nos tecidos de reserva, a concentração dos inibidores de proteínases decresce durante a germinação, o que aparentemente sugere um papel de reserva (RYAN, 1981).

Contudo, essa hipótese também é questionada posto que, em alguns casos, verifica-se que a mobilização dos inibidores durante a germinação não acompanha a das principais

proteínas de reserva (XAVIER FILHO, 1980). Existem ainda registros sobre o aumento do conteúdo de inibidores ao longo do processo germinativo (RICHARDSON, 1977).

Recentes trabalhos relatam fortes diferenças entre a taxa de aparecimento e desaparecimento entre espécies de inibidores das famílias do Kunitz e de Bowman-Birk, o que sugere um mecanismo diferencial na utilização desses dois tipos de proteína e uma possível diferença funcional na planta de soja. (TAN-WILSON et al., 1982).

1.3 - Objetivos

Não obstante todas as postulações aqui discutidas, ainda não foi atingido um consenso sobre o papel fisiológico dos inibidores de proteinase. É pois oportuno sugerir que os inibidores façam parte de uma classe de proteínas caracterizada por baixo peso molecular, ponto isoelétrico ácido, alto teor de cistina e aminoácidos ácidos, resistentes à ação do calor e pHs ácidos e muito resistentes à ação de enzimas proteolíticas. De um certo modo, essas características seriam determinantes no sentido de possibilitar que essas substâncias funcionassem como inibidores de proteinases e talvez de outras enzimas (XAVIER FILHO, 1980). É importante salientar que foram encontrados inibidores de α -amilase pancreática estáveis ao calor e a pHs ácidos em extratos de leguminosas (JAFFÉ et al., 1973). A classe de proteína que compartilha dessas características seria em algumas espécies constituída quase que integralmente de inibidores de proteinases, enquanto que, em outras espécies, os inibidores constituiriam uma fração desprezível dessa classe de proteínas.

O objetivo deste trabalho é caracterizar parcialmente uma fração extraída de *Vigna unguiculata* cv. Seridó resistente ao calor e a pH ácido e rica em inibidores de tripsina. Tendo em vista a sugestão de que os inibidores de proteinases compõem uma classe de proteínas com algumas propriedades

físico-químicas comuns, o estudo de uma Fração resistente ao calor, e a tratamento ácido e com alto conteúdo de inibidor de tripsina provavelmente poderá fornecer dados que possibilitem a discussão dessa hipótese. A Fração Resistente ao Calor (FRC) foi estudada quanto a sua capacidade de inibir enzimas de diferentes classes mecanísticas, como também será caracterizada através de métodos eletroforéticos e cromatográficos.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Materiais

2.1.1 - Material Vegetal

Sementes quiescentes de **Vigna unguiculata** (L.) Walp. cv. Seridó utilizadas no presente trabalho foram fornecidas pelo Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

2.1.2 - Material Animal

Pré-pupas e pupas de **Callosobruchus maculatus** (Fabr.).

2.1.3 - Outros Materiais

Tripsina bovina - Preparação duas vezes cristalizada. Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA.

Tripsina porcina - Preparação cristalizada. Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Pepsina - Preparação três vezes cristalizada. Nutritional Biochemicals Co. (NBCo), EUA.

α -Quimiotripsina bovina - Preparação três vezes cristalizada. Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Subtilisina BPN' - Preparação cristalizada, tipo IV de **Bacillus amyloliquefaciens**, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Papaína - Suspensão de uma preparação duas vezes cristalizada. Nutritional Biochemicals Co. (NBCo), Cleveland, Ohio, EUA.

Pronase - Preparação cristalizada, tipo V. de Streptomyces griseus. Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Caseína - Preparada segundo Hammarsten. E. Merck AG., Darmstadt, República Federal da Alemanha.

Hemoglobina bovina - Preparação cristalizada. Worthington Biochemical Co., New Jersey, EUA.

α-N-Benzoil -DL-arginina-p-nitroanilida - Preparação cristalizada. Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Q-Dianisidina tetrazonizada - E. Merck AG., Darmstadt, República Federal da Alemanha.

Anfólitos carreadores - LKB Produkter, Suécia.

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

2.2 - Métodos

2.2.1 - Farinha de Sementes

Sementes quiescentes de Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. Seridó foram usadas para a preparação da farinha. Inicialmente processou-se a remoção do tegumento e em seguida as sementes foram trituradas em um moinho de café Braun Aromatic KSMI. A farinha de sementes foi conservada em refrigerador a 5°C e usada para preparar a Fração Resistente ao Calor (FRC).

2.2.2 - Preparação da Fração Resistente ao Calor (FIGURA 1)

A FRC foi preparada de acordo com o seguinte esquema:

Etapa 1 - Extração com tampão borato 0,1 M contendo NaCl 0,3 M, pH 8,0, na proporção de 1:10 (farinha/meio de extração), à temperatura ambiente (25-28°C), durante 60 minutos, sob agitação constante. Após a extração o material foi filtrado em tecido fino e em seguida centrifugado a 13.300xg por 30 minutos a 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante usado na etapa seguinte.

Etapa 2 - Tratamento do sobrenadante por HCl 1,0 N até o pH da mistura atingir o valor de 3,0, permanecendo em repouso por 20 minutos, após o que a suspensão foi centrifugada a 19.200xg por 30 minutos a 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante coletado e usado na etapa 3.

Etapa 3 - Aquecimento do sobrenadante por 5 minutos entre 60 e 80°C e posterior resfriamento à temperatura ambiente, após o que o material foi centrifugado a 19.200xg por 30 minutos a 4°C. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante recolhido.

Etapa 4 - Precipitação do sobrenadante com sulfato de amônio a 80% de saturação e posterior centrifugação a 19.200xg por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em água destilada. A solução resultante foi dialisada contra água e, em seguida, liofilizada.

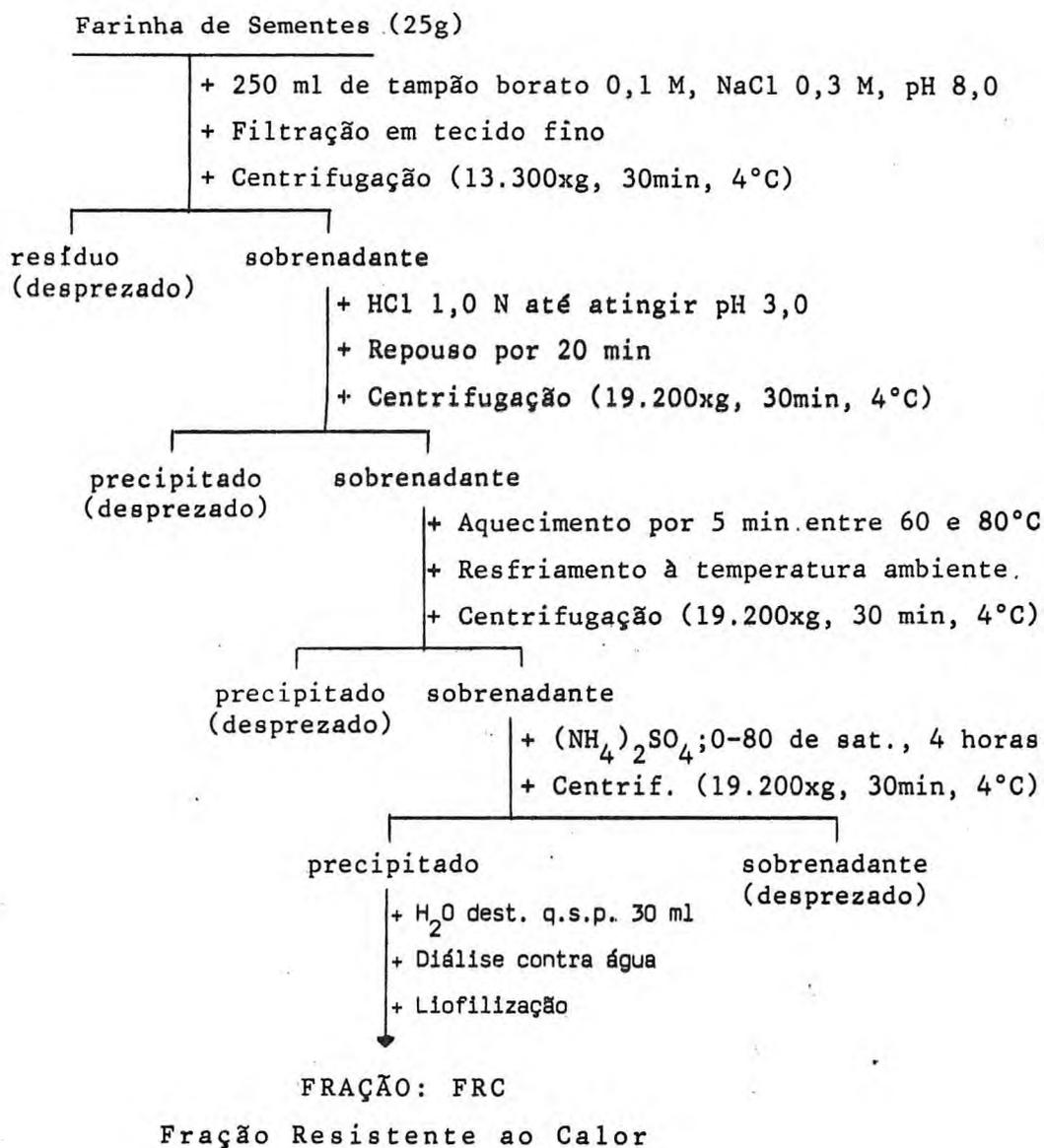


FIGURA 1 - Esquema de obtenção da Fração Resistente ao Calor e a pHs ácidos de extrato de sementes quiescentes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. Seridó.

2.2.3 - Preparação da Fração 25/50

A preparação da F 25/50 baseou-se no método de AINOUZ et al. (1981). A fração obtida a partir de farinha de sementes quiescentes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Seridó tendo tampão fosfato 0,02 M, pH 7,6 como meio de extração, na proporção de 1.5 (farinha/tampão). O tempo de extração foi cerca de 3 horas. O homogenato resultante foi filtrado em tecido de nylon e centrifugado a 7.200xg, por 30 minutos a 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante submetido ao tratamento com sulfato de amônio no intervalo de 0-25% de saturação, por 4 horas. O precipitado foi removido por centrifugação (7.200kg, por 30 minutos, a 4°C) e o sobrenadante novamente tratado com sulfato de amônio, no intervalo de 25-50% de saturação. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado redissolvido no tampão de extração e dialisado contra água a 4°C. A fração assim obtida foi liofilizada e armazenada no congelador para determinação da ação da FRC sobre as atividades BAPA-ásica, caseinásica e hemoglobínásica da Fração 25/50.

2.2.4 - Preparação de Azo-caseína

A azocaseína usada como substrato nos ensaios de atividade azo-caseinásica de *Callosobruchus maculatus* foi preparada essencialmente de acordo com o método de GOAD (1963) modificado por MAIA (1982). Foi feita uma solução contendo 0,616g de ácido sulfanílico, 0,084g de brometo de potássio, 45 ml de ácido clorídrico e 37 ml de água destilada. A mistura foi agitada em banho de gelo (0°C). Após equilíbrio, 18 ml de nitrito de sódio 0,2 M foram adicionados gota a gota à solução que permaneceu mais 15 minutos a 0°C e foi denominada ASD. Preparou-se uma solução de caseína a 2% em NaOH 0,1 N pH 10, a qual foi adicionada gota a gota à solução de ASD, em banho de gelo. O pH era mantido em torno de 10 pela

adição de NaOH 1,0 N. A mistura permaneceu por mais 15 minutos a 0°C sob constante agitação. Após este tempo o pH da mistura foi ajustado a 7,0 por adição de HCl 1,0 N, o que deteve a reação. A solução resultante foi dializada contra NaCl 0,1 M e contra água destilada. Acrescentou-se TCA 100% à mistura, de modo que a concentração da solução final fosse 2% do ácido. A suspensão ficou em repouso por 15 horas quando foi filtrada a vácuo e o precipitado lavado com um litro de TCA a 2,5%. O precipitado foi ressuspensão em 100 ml de água destilada, dialisado e liofilizado.

2.2.4.1 - Preparação das Soluções de Azo-caseína

Uma das soluções de azo-caseína utilizadas como substrato foi preparada a 1% em tampão acetado 0,3 M, pH 5,0. A outra foi preparada a 1,5% em tampão Universal pH 8,0. Ambas foram aquecidas e deixadas em ebulição por 15 minutos. Os pHs das soluções foram ajustados a 5,0 e 8,0 respectivamente. Os volumes completados a 100 ml com água destilada. As soluções foram mantidas no congelador (-19°C).

2.2.5 - Preparação dos Extratos de *Callosobruchus maculatus*

As pupas e pré-pupas de *Callosobruchus maculatus* foram desenvolvidas em *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Pitiúba. Os extratos foram preparados a partir de pré-pupas e pupas do inseto para determinação das atividades azo-caseinásicas alcalina (LOPES, 1985) e ácida (COELHO, 1980), respectivamente. O meio de extração foi glicerina a 10% na proporção de 10 pré-pupas por ml e 3 pupas por ml. O material foi macerado em almofariz e extraído por 30 minutos, sob agitação constante em câmara fria. Os homogenatos resultantes foram centrifugados por 30 minutos a 2.500xg. O precipitado foi des-

prezado e o sobrenadante filtrado e conservado em congelador (-19°C).

2.2.6 - Determinação de Nitrogênio Total

O conteúdo total de nitrogênio na amostra foi determinado pelo método de Kjeldahl (HILLER et al., 1948) e expresso em termos de peso seco.

2.2.7 - Determinação de Carboidrato

Uma amostra de 4,0 mg da FRC foi dissolvida em 2,0 ml de tampão fosfato 0,02 M pH 7,6 para determinação de carboidratos pelo método de DUBOIS et al. (1956). Aliquotas de 1,0 ml foram tratadas com 1,0 ml de fenol 5% e 5,0 ml de ácido sulfúrico concentrado. Após 20 minutos a densidade ótica em 490 nm foi determinada em espectrofotômetro Spekol. O teor de carboidrato da amostra foi determinado usando-se glicose como padrão.

2.2.8 - Atividades Enzimáticas e Inibitórias

2.2.8.1 - Atividade da Tripsina

A atividade triptica foi medida pelo método de KUNITZ (1947). Foi preparada uma solução de tripsina (0,4 mg/ml em HCl 0,0025 N) que, por ocasião do ensaio, foi diluída em HCl 0,0025 N para cerca de 10-20µg/ml. O meio de reação encerrava 1,0 ml da solução enzimática em concentrações crescentes, 1,0 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6 e 1,0 ml de

caseína 1%, pH 7,6. A mistura foi incubada a 37°C por 20 minutos e a reação parada por adição de 3,0 ml de TCA 5% (p/v). Após 20 minutos de repouso, o precipitado foi removido por centrifugação e uma alíquota de 1,0 ml do sobrenadante foi corada pelo método de Folin modificado por LOWRY (1951). A densidade ótica em 750 nm foi usada como medida da concentração dos produtos de hidrólise da caseína. Provas em branco das concentrações extremas de tripsina foram preparadas adicionando-se o TCA 5% antes da adição de caseína. As concentrações intermediárias foram determinadas por interpolação.

2.2.8.1.1 - Ação da FRC sobre a Atividade da Tripsina

A atividade inibitória da FRC sobre tripsina foi avaliada por comparação de amostras contendo quantidades crescentes da fração na presença de quantidades fixas da enzima com amostras contendo apenas a enzima nas mesmas condições de ensaio. A volumes crescentes de uma solução da FRC na concentração de cerca de 6,5 µg/ml, adicionou-se tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6 até um volume final de 1,5 ml. A esta solução acrescentou-se 0,5 ml de tripsina numa concentração de 8,6 µg/ml, mantendo-se as demais condições anteriormente descritas. A atividade anti-triptica foi expressa em Unidade de Inibidor (UI) definida por XAVIER FILHO (1974).

2.2.8.2 - Atividade da Quimiotripsina

Foram preparadas soluções estoque de quimiotripsina dissolvida em água destilada na concentração de 0,2 mg/ml. A atividade enzimática foi determinada pelo ensaio caseinolítico de KUNITZ (1947) já descrito anteriormente para determinação da atividade da tripsina.

2.2.8.2.1 - Ação da FRC sobre a Atividade da Quimiotripsina

A atividade inibitória da FRC sobre quimiotripsina foi estimada por comparação de amostras contendo quantidades crescentes da fração na presença de quantidades fixas de enzima, nas mesmas condições de ensaio. Tampão fosfato 0,1 M pH 7,6 foi adicionado a volumes crescentes de uma solução da FRC na concentração de 28 $\mu\text{g/ml}$ até um volume final de 1,5 ml. Adicionou-se 0,5 ml de quimiotripsina numa concentração de 14 $\mu\text{g/ml}$. As demais condições de ensaio foram mantidas de acordo com o item 2.2.8.1.

2.2.8.3 - Atividade da Pepsina

Foram preparadas soluções estoque de pepsina (0,1 mg/ml) dissolvida em ácido clorídrico 0,3 M e água destilada na proporção de 1:4. No ensaio de atividade, usou-se uma solução diluída de pepsina na concentração de cerca de 20-50 $\mu\text{mg/ml}$ em volumes crescentes, completando-se para 2,7 ml com HCl 0,3 M. Essas soluções foram incubadas com 1,0 ml hemoglobina a 2% (p/v) em HCl 0,3 M e água destilada (1:4) durante 10 minutos a 37°C. A reação foi parada pela adição de 2,5 ml de TCA 8% (p/v). Após 30 minutos de repouso as suspensões foram filtradas.

A densidade ótica do filtrado em 280 nm foi determinada em espectrofotômetro Beckman Dv. Foram feitas provas em branco para as concentrações extremas de pepsina, sendo que, nesses casos, a adição de TCA precedeu a de hemoglobina. Correções para concentrações intermediárias foram obtidas por interpolação.

2.2.8.3.1 - Ação da FRC sobre a Atividade da Pepsina

A ação da FRC sobre a atividade da pepsina foi avaliada por comparação de amostras contendo FRC e a enzima e amostras contendo somente enzima, nas mesmas condições de ensaio. O meio de reação encerrava 0,5 ml de pepsina, 0,5 ml de uma solução da FRC em concentrações crescentes (0,01; 0,1; 1,0; e 5,0 mg/ml) e 1,7 ml de HCl 0,3 M. Essa mistura foi incubada com 1,0 ml de hemoglobina 2% (p/v) a 37°C por 10 minutos. Foram mantidas as demais condições de ensaio.

2.2.8.4 - Atividade da Subtilisina BPN'

A atividade caseinolítica da subtilisina foi determinada pelo método de HAGIHARA et al. (1958a) e HAGIHARA et al. (1958b). Preparou-se uma solução de subtilisina a 80 µg/ml, dissolvida em cloreto de sódio 0,02 M. Volumes crescentes dessa solução, previamente diluída para 25 µmg/ml em NaCl 0,02 M, foram misturados com tampão fosfato de amônio 1,0 M, pH 7,5, até atingir o volume total de 1,0 ml. Acrescentou-se 2,5 ml de caseína a 1,2% em tampão fosfato de amônio 1,0 M, pH 7,5 a 30°C. passados 10 minutos de incubação a reação foi detida pela adição de 5,0 ml do reagente A (0,11 M de TCA, 0,22 M de acetato de sódio e 0,33 M de ácido acético). Após 30 minutos de repouso, as suspensões foram filtradas em papel de filtro quantitativo e retiradas alíquotas de 1,0 ml para determinação de proteína pelo método de Folin modificado por LOWRY (1951). A densidade ótica do filtrado foi medida no espectrofotômetro Spekol a 750 nm, e tomada como evidência da atividade da enzima. Nos ensaios de controle a adição do reagente de precipitação ocorreu antes da adição da caseína.

2.2.8.4.1 - Ação da FRC sobre a Atividade da Subtilisina BPN'

Experimentos para testar a inibição da subtilisina pela FRC foram feitos adicionando-se 0,5 ml da solução de subtilisina 25 µg/ml em 0,5 ml de soluções da FRC em concentrações crescentes, dissolvida em tampão fosfato 0,03 M pH 7,5. A essa mistura acrescentou-se 0,5 ml do mesmo tampão. As soluções assim obtidas foram usadas para a determinação da atividade caseinolítica da enzima de acordo com o método previamente descrito no item anterior. Provas em branco para a enzima e para as concentrações extremas de FRC foram feitas.

2.2.8.5 - Atividade da Papaína

O ensaio para determinação da atividade proteolítica da papaína baseou-se no método de KUNITZ (1947), adaptado para essa enzima por ARNON et al. (1970). Preparou-se uma solução estoque de papaína 0,05 mg/ml em água destilada. Tomaram-se volumes crescentes desta solução (0,1 a 0,8 ml) adicionou-se 0,2 ml do agente ativador (0,05 M cisteína + 0,02 M de EDTA pH 8,0) e completou-se o volume para 1,0 ml com o tampão tris-HCl 0,05 M, pH 8,0. A mistura foi equilibrada a 37°C e em seguida adicionou-se 1,0 ml de solução de caseína a 1% em tampão tris-HCl 0,05 M, pH 8,0. Completados 10 minutos de incubação a 37°C, a reação foi detida por 3,0 ml de TCA 5%. Após uma hora de repouso a 25°C as suspensões foram filtradas e retiradas alíquotas do filtrado para determinação da densidade ótica da solução a 280 nm. As leituras foram corrigidas por provas em branco, nas quais o TCA 5% é adicionado antes da adição da caseína.

2.2.8.5.1 - Ação da FRC sobre a Atividade da Papaína

Para verificar se a FRC inibia a ação da papaína, adicionou-se 1,0 ml da FRC em concentrações crescentes (0,001 mg/ml a 5,0 mg/ml) em tubos contendo 0,5 ml de papaína a 0,05 g/ml, mais 0,2 ml do agente ativador e 0,3 ml do tampão tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 mais 1,0 ml de caseína 1%. Em seguida, determinou-se a atividade proteínásica residual da papaína, conforme o método já descrito no item anterior. Provas em branco para a enzima e para o inibidor foram feitas.

2.2.8.6 - Atividade da Pronase

A atividade proteínásica da pronase foi determinada pelo método de digestão da caseína, baseado no método de Kunitz modificado por HAGIHARA, citado por NARAHASHI (1970). Preparou-se uma solução 40 µg/ml de pronase em tampão borato de sódio 0,1 M contendo 0,05 M de HCl e 5,0 mM de cloreto de cálcio, pH 7,5. Volumes crescentes (0,2 a 2,0 ml) da solução de enzima foram adicionados ao mesmo tampão até atingir um volume total de 2,0 ml. A mistura foi equilibrada a 40°C e adicionou-se 2,0 ml de uma solução de caseína 2% em tampão borato de sódio 0,1 M, pH 7,5. Passados 10 minutos, a reação foi parada pela adição de 4,0 ml do reagente de precipitação (0,11 M de TCA contendo 0,22 M de fosfato de sódio e 0,33 M de ácido acético). A suspensão resultante foi filtrada após 20 minutos de repouso a 40°C. A densidade ótica do filtrado foi lida a 275 nm. Os valores das leituras foram corrigidos pelas provas em branco preparadas pela adição do reagente de precipitação antes da adição do substrato.

2.2.8.6.1 - Ação da FRC sobre a Atividade da Pronase

Os experimentos para os testes de inibição foram feitos adicionando-se 1,0 ml da solução de FRC em concentrações crescentes (0,001 mg/ml a 5,0 mg/ml) em tubos contendo 1,0 ml da solução da enzima na concentração de 40 µg/ml. Acrescentou-se 1,0 ml de caseína a 2%. A reação processou-se por 10 minutos quando adicionou-se o reagente de precipitação. Após 20 minutos de repouso a densidade ótica a 275 nm foi determinada.

2.2.8.7 - Atividade Azo-caseinásica Ácida de Extrato de *Callosobruchus maculatus*

Nos experimentos para determinação da atividade azo-caseinásica ácida do extrato de *Callosobruchus maculatus* foi usado o método desenvolvido por COELHO (1980). O meio de reação continha 1,0 ml de extrato de pupas em concentrações crescentes e 2,0 ml de azo-caseína 1% em tampão acetato 0,3 M, pH 5,0. A mistura foi incubada por 30 minutos a 50°C, sendo então a reação parada pela adição de 1,0 ml de TCA 20% (p/v). Passados 30 minutos de repouso as suspensões foram filtradas e retiradas alíquotas de 1,0 ml do filtrado, as quais foram alcalinizadas com 1,0 ml de NaOH 2,0 M. A atividade enzimática foi medida pela absorbância em 440 nm dos peptídeos diazotizados. Prepararam-se controles onde o substrato e a enzima eram incubados separadamente, sob as mesmas condições, e misturados após a adição de TCA 20% (p/v).

2.2.8.7.1 - Ação da FRC sobre a Atividade Azo-caseinásica Ácida de Extrato de **Callosobruchus maculatus**

Amostras de 1,0 ml da FRC em concentrações crescentes foram preparadas em tampão acetato 0,3 M, pH 5,0. Adicionou-se às soluções 1,0 ml do mesmo tampão e 1,0 ml de extrato de pupas (3 pupas/ml). A mistura foi incubada com 1,0 ml de azo-caseína 1%, pH 5,0 a 50°C por 30 minutos. O ensaio prosseguiu como descrito para a determinação da atividade azo-caseinásica ácida de **Callosobruchus maculatus**.

2.2.8.8 - Atividade Azo-caseinásica Alcalina de Extrato de **Callosobruchus maculatus**.

Para determinação da atividade azo-caseinásica alcalina de extrato de **Callosobruchus maculatus** foi usado o método desenvolvido por LOPES (1985). O meio de reação continha 1,0 ml de extrato bruto de pré-pupas de **Callosobruchus maculatus** (10 pré-pupas/ml), 1,0 ml de tampão Universal pH 8,0, 1,0 ml de azo-caseína 1,5% (p/v) em tampão Universal pH 8,0 como substrato. A mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C e em seguida precipitada por 1,0 ml de TCA 20% (p/v). Após 30 minutos de repouso as amostras foram filtradas. Aliquotas de 1,0 ml do filtrado foram alcalinizadas por 1,0 ml de NaOH 2,0 N e determinada sua absorbância em 440 nm. Provas em branco foram preparadas adicionando-se TCA 20% (p/v) antes da adição de substrato.

2.2.8.8.1 - Ação da FRC sobre a Atividade Azo-caseinásica Alcalina de **Callosobruchus maculatus**

A ação da FRC sobre a atividade azo-caseinásica alcalina de **Callosobruchus maculatus** foi avaliada através do

seguinte ensaio: 1,0 ml do extrato de pré-pupas (10 pré-pupas/ml) e 1,0 ml de solução de FRC em concentrações crescentes (0,01; 0,1; 1,0; 5,0 mg/ml) foram incubados com 1,0 ml de azo-caseína a 1,5% (p/v), em tampão Universal pH 8,0 por 30 minutos a 37°C. O ensaio prosseguiu mantendo-se as demais condições estabelecidas para a determinação da atividade azo-caseinásica alcalina de extrato de *Callosobruchus maculatus*. Provas em branco para a FRC e para a enzima foram preparadas.

2.2.8.9 - Atividade Caseinásica da Fração 25/50

A atividade caseinásica da F 25/50 de *Vigna unguiculata* cv. Seridó foi determinada de acordo com AINOUZ et al. (1981). Foram incubados 0,5 ml da F 25/50 a 10 mg/ml em tampão fosfato 0,02 M, pH 6,0, com 5,0 ml de caseína a 1% (p/v) em tampão fosfato 0,02 M, pH 6,0, durante 30 minutos a 50°C. Adição de 1,0 ml de TCA a 40% (p/v) serviu para parar a reação enzimática. As suspensões resultantes foram filtradas após 30 minutos de repouso. Alíquotas de 1,0 ml dos filtrados foram tratadas pelo método de Folin modificado por LOWRY (1951). A absorbância em 750 nm foi tomada como medida da atividade caseinásica da F 25/50. Substrato e enzima foram incubados separadamente como amostra-controle, onde a adição de TCA 40% (p/v) precedeu a adição de caseína 1% (p/v), pH 6,0.

2.2.8.9.1 - Ação da FRC sobre a Atividade Caseinásica da F 25/50

O efeito da FRC sobre a atividade caseinásica da F 25/50 foi estudado usando o seguinte ensaio: 0,5 ml da FRC em concentrações crescentes (0,01; 0,1; 1,0; e 5,0 mg/ml) e

0,5 ml da F 25/50 (10 mg/ml) foram incubadas com 5,0 ml de caseína a 1% (p/v) em tampão fosfato 0,02 M, pH 6,0, durante 60 minutos a 50°C. O ensaio prosseguiu mantendo-se as condições descritas para a atividade caseinásica de F 25/50. Provas em branco para a FRC e para a F 25/50 foram preparadas.

2.2.8.10 - Atividade BAPA-ásica da Fração 25/50

O método usado foi descrito por ERLANGER *et al.* (1961) e modificado por BEEVERS (1968). O α -N-Benzoil-FL-arginina-p-nitroanilida (BAPA) foi dissolvido em 1,0 ml de dimetilsulfóxido, em seguida completou-se o volume para 100 ml com tampão fosfato 0,02 M, pH 7,6, resultando numa concentração final da solução de $5 \cdot 10^{-4}$ M. O meio de reação encerrava 0,3 ml da F 25/50 em concentrações crescentes e 0,2 ml do tampão fosfato 0,02 M, pH 7,6 incubados com 2,5 ml de BAPA, a 40°C, por 15 minutos. A reação foi parada com 1,0 ml de ácido acético a 30% (p/v). O precipitado formado foi removido por centrifugação e a absorvância do sobrenadante foi lida em 410 nm. Amostras controle foram preparadas adicionando-se o reagente de precipitação antes da adição do substrato, nas mesmas condições de ensaio.

2.2.8.10.1 - Ação da FRC sobre a Atividade BAPA-ásica da Fração 25/50

O efeito da FRC sobre a atividade BAPA-ásica da Fração 25/50 foi estudado misturando-se 0,3 ml da F 25/50 na concentração de 10 mg/ml com 0,2 ml de FRC em diferentes concentrações ($5 \cdot 10^{-4}$ mg/ml a 5,0 mg/ml). Esta mistura foi incubada com 2,5 ml de BAPA na concentração de $5 \cdot 10^{-4}$ M por 15 minutos a 40°C. A avaliação da atividade inibitória da FRC foi feita pela medida da absorvância em 410 nm, após 15

minutos da adição de 1,0 ml de ácido acético a 30% (p/v). Provas em branco para o FRC e para a F 25/50 foram realizadas.

2.2.8.11 - Atividade Hemoglobínica da Fração 25/50

Hemoglobina foi previamente dissolvida em HCl 0,06 N e completado o volume com tampão acetato pH 3,5, resultando numa solução de hemoglobina a 1% (p/v). No ensaio, uma mistura de 5,0 ml desta solução 0,5 ml da solução F 25/50 na concentração de 10 mg/ml e 0,5 ml do tampão acetato pH 3,5 foi incubada por 60 minutos a 40°C. A reação foi parada pela adição de 1,0 ml de TCA a 40%. As suspensões foram filtradas após 30 minutos de repouso. O filtrado foi neutralizado e tratado com reagente de Folin, modificado por LOWRY (1951). A absorvância em 750 nm foi tomada como medida da atividade enzimática.

2.2.8.11.1 - Ação da FRC sobre a Atividade Hemoglobínica da Fração 25/50

Uma mistura de 5,0 ml de solução de hemoglobina a 1,0% (p/v) em tampão acetato 0,65 M, pH 3,5 e 0,5 ml da solução de F 25/50, 10 mg/ml e 0,5 ml de FRC em diferentes concentrações (0,01 mg/ml a 5,0 mg/ml) foi incubada a 40°C durante 60 minutos. Foi adicionado 1,0 ml de TCA a 40% (p/v) para deter a reação. O procedimento para determinação da atividade hemoglobínica residual foi feito conforme descrito anteriormente.

2.2.9 - Cromatografia em Sephadex G 100

O fracionamento por filtração em gel de Sephadex G 100 foi efetuado em coluna medindo 2,5 x 40 cm. O gel foi deixado em água destilada por 72 horas, sendo agitado ocasionalmente, em seguida deixado sedimentar livremente em uma coluna de vidro (Pharmácia K 25/45). Tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6 ou tampão acetato 0,1 M, pH 3,5 foram usados para equilibrar a coluna, à temperatura ambiente. Para determinar o volume de exclusão (V_o) da coluna, aplicou-se uma amostra de 20,0 mg de "Blue dextran" dissolvida em 2,0 ml do tampão de equilíbrio contendo sacarose a 10%. A eluição foi feita com o tampão de equilíbrio a um fluxo de 30 ml/hora. Frações de 3 ml foram recolhidas em coletor automático e as absorbâncias medidas em espectrofotômetro Spekol a 660 nm. Na coluna previamente equilibrada aplicou-se uma amostra de 2,0 ml de FRC a 25 mg/ml dissolvida no tampão de equilíbrio contendo sacarose a 10%. A eluição processou-se conforme descrito, sendo as absorbâncias determinadas a 280 nm. As frações foram reunidas em grupos para determinação das atividades anti-trípica e anti-quimiotrípica, utilizando as condições padrão de ensaio já estabelecidas. Os pesos moleculares foram determinados a partir da fórmula de DETERMAN e MICHEL (1966):

$$\log M = 5.941 - 0,847 (V_e/V_o), \text{ onde}$$

V_e = volume de eluição

V_o = volume de exclusão

2.2.10 - Cromatografia de Troca Iônica

Cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose foi utilizada como método de caracterização da fração em estudo (FRC). Após suspensão em água, a DEAE-celulose foi submetida a sucessivas lavagens com NaOH 0,1 N, água destilada, HCl

0,1 N. Água destilada e tampão de equilíbrio (tampão fosfato 0,005 M pH 7,0). Em seguida, o adsorvente foi empacotado sob ação da gravidade em uma coluna de vidro de 27 x 2,0 cm. A amostra contendo 100 mg de FRC dissolvidas em 4,0 ml do tampão fosfato 0,005 M, pH 7,0 foi dializada por uma noite contra o mesmo tampão. O precipitado foi removido por centrifugação (cinco minutos, 2.500xg) e o sobrenadante aplicado na coluna. O fluxo usado foi de 17 ml/hora, e as frações de 4,0 ml foram recolhidas em um coletor automático LKB. De início, a eluição foi feita com o tampão de equilíbrio da coluna, em seguida continuada com um gradiente linear de NaCl (0-1,5 M, 400 ml) no mesmo tampão. A absorbância do efluente foi determinada a 280 nm. As frações foram testadas quanto à atividade inibitória contra tripsina e quimiotripsina. As unidades de inibidor foram calculadas para cada fração.

2.2.11 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida a pH 8,1

As eletroforeses em gel de poliacrilamida a pH 8,1 foram feitas de acordo com o método desenvolvido por CLARKE (1964). Todos os experimentos foram efetuados a temperatura ambiente com voltagem constante (200 volts). Amostras de FRC, em diferentes concentrações, contendo 10% de glicose, foram aplicadas e submetidas a eletroforese. Para corar os géis utilizou-se negro de amido a 1% em ácido acético a 7%, durante 60 minutos. O descoramento se processou por difusão em ácido acético a 7%.

Os inibidores de tripsina foram detectados por eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,1 de acordo com a técnica de URIEL & BERGES (1968) e KAISER & BELITZ (1971). Após a corrida eletroforética os cilindros de gel foram retirados dos tubos de vidro e incubados em uma solução de tripsina bovina (0,1 mg/ml em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6), a 37°C, por 30 minutos. Transcorrido este tempo, os géis foram lavados seis vezes em água destilada e reincubados a

37°C por mais 30 minutos. Em seguida foram imersos em uma mistura de acetil-DL-fenilalanina- β -naftil ester (APNE) (2,5 mg/ml em dimetilformamida) com uma solução de O-dianisidina tetrazotizada (0,55 mg/ml em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4) na proporção 1:9. Passados 30 minutos os cilindros de gel foram retirados desta mistura e lavados com solução de ácido acético 7%, onde foram conservados.

2.2.12 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS

Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS foi feita segundo a técnica de WEBER & OSBORN (1964). As amostras foram dissolvidas em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0 contendo 2% de SDS. A eletroforese processou-se durante quatro horas, com corrente constante e igual a 6 mA por coluna de gel, a temperatura ambiente. Terminada a corrida, os cilindros de gel foram imersos em solução de Coomassie Brilliant Blue 0,005% por cerca de 15 horas. O descoramento foi feito pela imersão dos cilindros em ácido acético a 7%, onde foram conservados. Também foi feita eletroforese para visualização de inibidores de tripsina e determinação de peso molecular. Nestes experimentos, seguiu-se a técnica descrita por XAVIER FILHO & MOREIRA (1978).

2.2.13 - Focalização Isoelétrica em Placas de Gel de Poliacrilamida

Nos experimentos de focalização isoelétrica foi utilizado essencialmente o método de AWDEH *et al.* (1968) adaptado por XAVIER FILHO & SOUSA (1979). As placas foram preparadas usando-se água destilada, solução de acrilamida 30%, contendo bis-acrilamida 1%, mistura de anfólitos (pH 3,0 a 6,0, 40%) e persulfato de amônio (10 mg/ml) na proporção de 80:

30:3:7 (v:v:v:v). Esta solução foi aplicada entre duas placas de vidro (12x9 cm) espaçadas por fitas elásticas de 0,5 mm de espessura e conservadas em posição por outras duas fitas elásticas. Após polimerização, uma das placas de vidro foi retirada. A amostra foi aplicada no lado do catodo e a eletrofocalização desenvolveu-se por quatro horas numa câmara úmida. A voltagem máxima aplicada foi de 200 volts. O volume de amostra aplicado foi de 10 µl de FRC na concentração de 4 mg/ml. O experimento foi desenvolvido até a corrente alcançar um mínimo de 0,5 mA. Uma tira longitudinal de gel medindo 0,5 cm de largura foi retirada e cortada em secções de 0,5 cm de comprimento e postas a eluir em água destilada por 16 horas. O pH correspondente a cada secção foi então medido para a determinação do gradiente. A visualização dos inibidores de tripsina foi feita segundo o método do coramento negativo, descrito por URIEL & BERGES (1968) e adaptado por XAVIER FILHO & SOUSA (1979).

3 - RESULTADOS

3.1 - Determinação de Nitrogênio Total

A quantidade de nitrogênio total na FRC foi avaliada pelo método de Kjeldahl (HILLER *et al.*, 1948). A FRC contém 17,2% de nitrogênio total, o que não permite uma determinação exata do teor de proteína, visto que o conteúdo de nitrogênio não protéico não foi determinado.

3.2 - Determinação de Carboidrato

De acordo com o método de DUBOIS *et al.* (1956), usado na determinação de carboidrato, a FRC contém 2,25% de carboidrato, tomando-se glicose como padrão.

3.3 - Ação da FRC sobre as Atividades Proteolíticas Estudadas

3.3.1 - Ação da FRC sobre a Atividade da Tripsina Bovina

A FRC foi testada quanto à sua capacidade de inibir a atividade proteolítica da tripsina bovina. Esta ação inibitória foi avaliada pela atividade residual da tripsina na presença da FRC (FIGURA 2). As unidades de inibidor presentes na fração, determinadas segundo XAVIER FILHO (1974), mostram que a FRC contém 278 UI/mg.

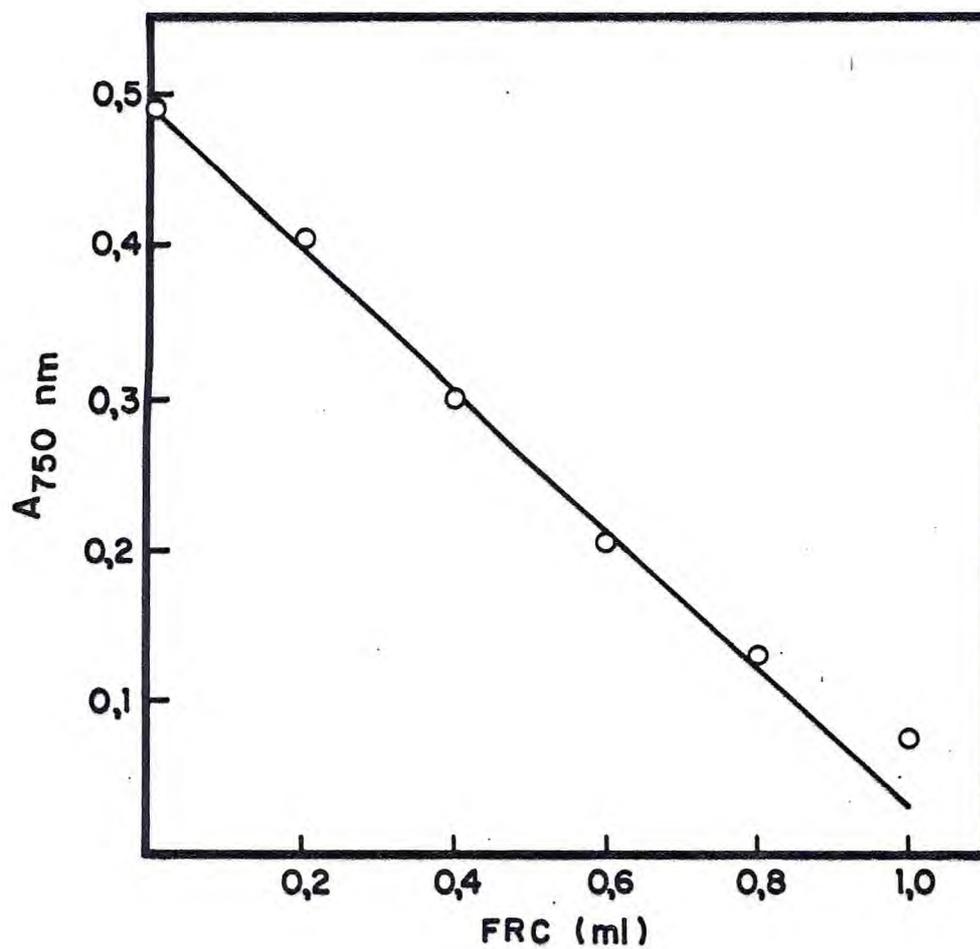


FIGURA 2 - Atividade anti-trípica da FRC. Tripsina bovina na concentração de 9 $\mu\text{g/ml}$. FRC na concentração de 7 $\mu\text{g/ml}$. Unidades de Inibidor: 278 UI/mg FRC.

3.3.2 - Ação da FRC sobre a Atividade da Tripsina Porcina

A FIGURA 3 apresenta os resultados dos experimentos de determinação da atividade inibitória da FRC sobre tripsina porcina. Verificou-se que a FRC também inibe esta enzima e apresenta um conteúdo de inibidor equivalente a 230 UI/mg.

3.3.3 - Ação da FRC sobre a Atividade da Quimiotripsina Bovina

A investigação da presença de inibidores da atividade quimiotriptica na fração em estudo levou aos resultados mostrados na FIGURA 4. Observa-se então que nas condições de ensaio a FRC inibe a quimiotripsina bovina, apresentando um conteúdo de 54 UI/mg.

3.3.4 - Ação da FRC sobre a Atividade da Pepsina

A TABELA 1 mostra as diferentes concentrações de FRC usadas nos experimentos e as atividades residuais da pepsina observadas nas condições de ensaio. Por esses dados não é possível estabelecer uma relação do tipo inibitória entre FRC e enzima. Pelo contrário, os resultados sugerem que a FRC pode estar envolvida em processos de ativação da pepsina, e/ou sendo hidrolizada pela enzima.

3.3.5 - Ação da FRC sobre a Atividade da Pronase

A atividade anti-pronásica da FRC foi estudada pelo decréscimo da atividade proteínásica da enzima quando soluções de FRC eram adicionadas ao sistema de ensaio. Os resul-

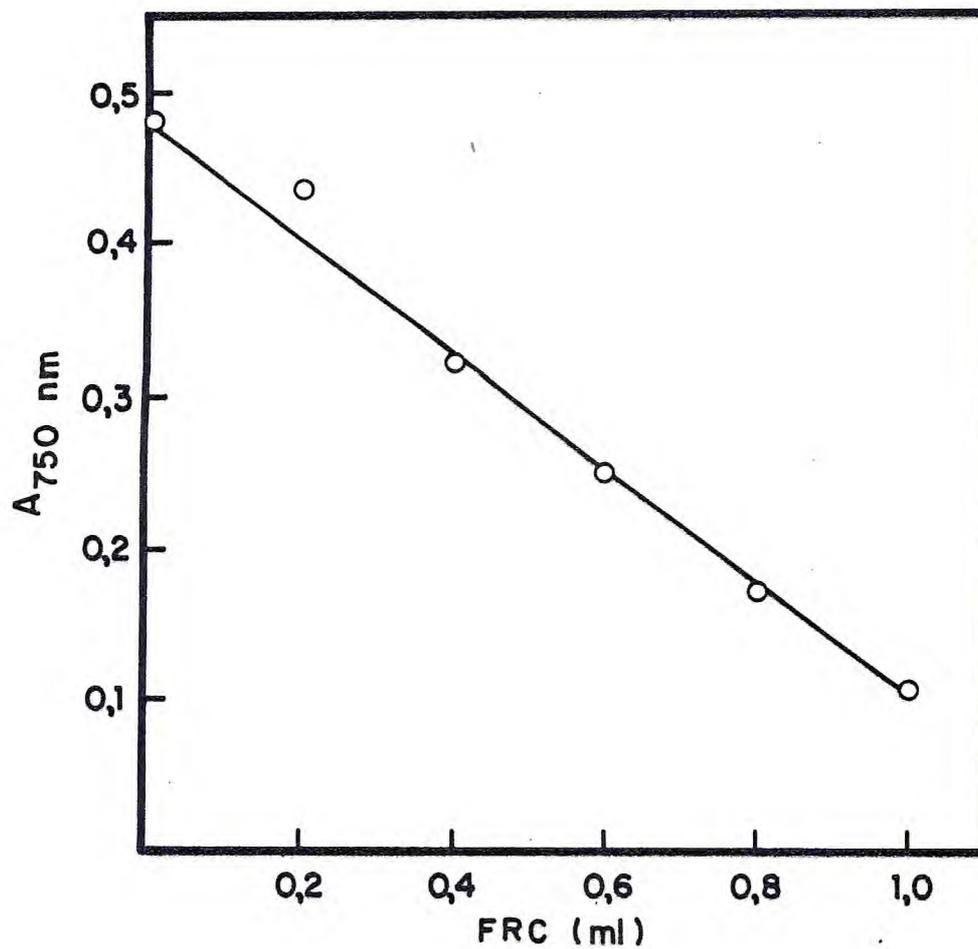


FIGURA 3 - Atividade anti-tríptica da FRC. Tripsina porcina na concentração de 9,5 $\mu\text{g/ml}$. FRC na concentração de 7 $\mu\text{g/ml}$. Unidades de Inibidor: 230 UI/mg FRC.

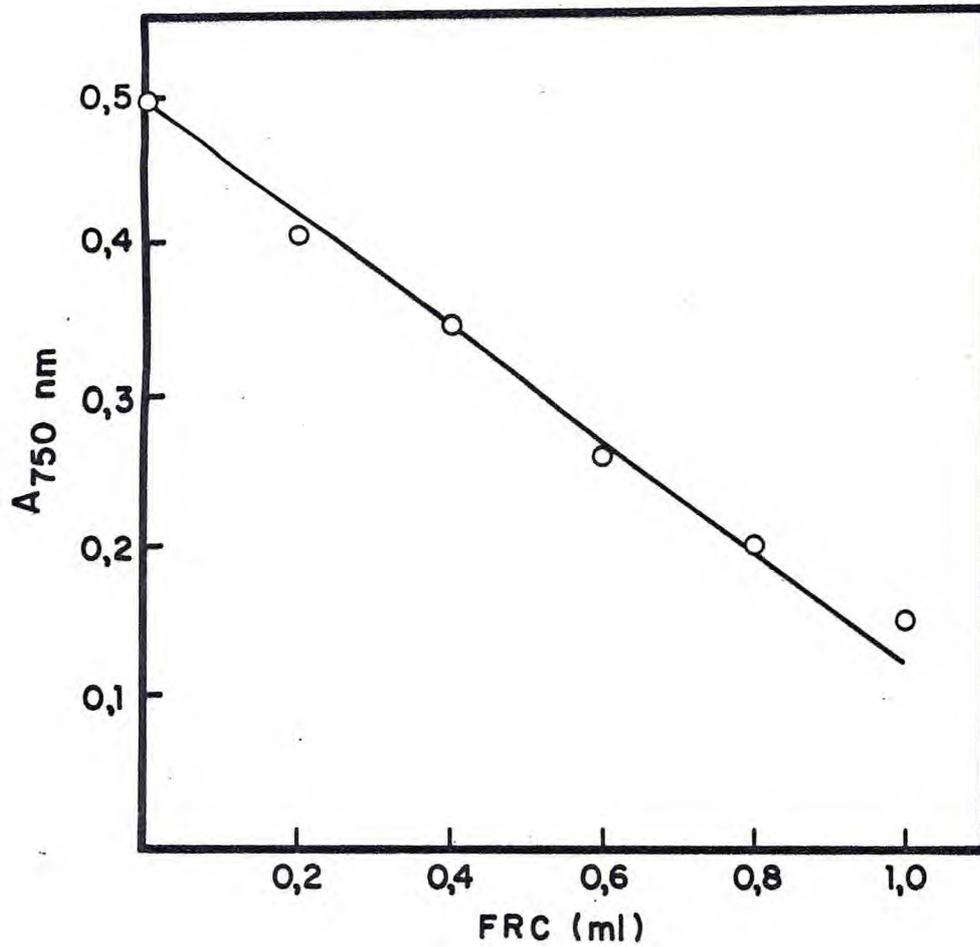


FIGURA 4 - Atividade anti-quimiotriptica da FRC. Quimiotripsina na concentração de 70 $\mu\text{g/ml}$. FRC na concentração de 28 $\mu\text{g/ml}$. Unidades de Inibidor: 54 UI/mg FRC.

TABELA 1 - Atividades residuais da pepsina, pronase, subtilisina BPN', papaína, azo-caseinases ácida e alcalina de *C. maculatus* e caseinase, hemoglobina-se e BAPA-ase da F 25/50 de *Vigna unguiculata*.

FRC mg/ml	Atividades residuais (%)								
	Pepsina	Pronase	Subtilisina BPN'	Papaína	Azo-caseinase alcalina de	Azo-caseinase ácida de	Caseinase	BAPA-ase	Hemoglobina-se
					<i>C. maculatus</i>				
0,00	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
0,01	98,9	96,2	94,8	98,1	100,0	102,6	104,9	97,6	97,2
0,10	104,1	90,2	106,1	102,8	95,8	104,0	104,9	94,1	101,3
1,00	106,2	69,8	94,8	109,0	104,1	101,3	107,8	93,0	101,3
5,00	121,8	52,8	98,9	112,7	95,8	101,3	103,9	89,5	93,1

tados apresentados na TABELA 1 indicam que a pronase é fracamente inibida pela FRC nas condições de ensaio sugerindo a presença de inibidor de pronase em concentrações muito baixas.

3.3.6 - Ação da FRC sobre a Atividade Proteolítica da Subtilisina BPN'

Investigou-se os efeitos da FRC sobre a atividade proteínásica da subtilisina BPN', enzima extraída de **Bacillus amyloliquefaciens**. Os resultados (TABELA 1) mostram a relação entre concentrações crescentes de FRC e as atividades residuais revelando que a FRC não foi capaz de inibir significativamente a atividade proteínásica da subtilisina BPN', nas condições experimentais estudadas.

3.3.7 - Ação da FRC sobre a Atividade Proteínásica da Papaína

A FRC foi também testada quanto à sua capacidade de inibir a atividade proteínásica da enzima papaína. A TABELA 1 indica que não resta dúvida de que a papaína, nas condições de ensaio, não é inibida pela FRC. Verificou-se também que o pequeno aumento na atividade residual da papaína, observada em alguns casos, não se deve à hidrólise da FRC por essa enzima.

3.3.8 - Ação da FRC sobre as Atividades Azo-caseinásica de Extrato Bruto de **Callosobruchus maculatus**

Como foi demonstrado por COELHO (1980) as pupas de **Callosobruchus maculatus** (Fabr.) apresentam forte atividade

azo-caseinásica a pH 5,0. Investigou-se então a ação da FRC sobre esta atividade proteínásica do extrato bruto de **C. maculatus**. Os resultados do teste de inibição estão mostrados na TABELA 1. LOPES (1985) encontrou uma elevada atividade proteínásica em pré-pupas de **C. maculatus** pH 8,0. Observando-se a TABELA 1 verifica-se claramente que a FRC não inibe as atividades azo-caseinásicas, tanto ácida como alcalina, do extrato bruto de **C. maculatus**.

3.3.9 - Ação da FRC sobre a Atividade Caseinásica da Fração 25/50 de **Vigna unguiculata**

Como foi demonstrado por AINOUZ *et al.* (1981), a Fração 25/50 extraída de **V. unguiculata** (L.) Walp. cv. Seridó apresenta atividades BAPA-ásica, caseinásica e hemoglobinasica. Esta fração foi preparada e em seguida estudou-se o efeito da FRC sobre essas atividades proteolíticas. O efeito da FRC sobre a atividade caseinásica da Fração 25/50 de **V. unguiculata** é mostrado na TABELA 1. Os resultados indicam que a FRC não tem ação inibitória sobre a atividade caseinásica da Fração 25/50.

3.3.10 - Ação da FRC sobre a Atividade BAPA-ásica da Fração 25/50 de **Vigna unguiculata**

Com relação à atividade BAPA-ásica, a TABELA 1 apresenta as diferentes concentrações da FRC usadas e as atividades residuais calculadas. Pela tabela verifica-se um pequeno decréscimo na atividade BAPA-ásica da Fração 25/50, quando concentrações crescentes de FRC são adicionadas ao sistema. Entretanto não se trata de uma inibição enzimática significativa. Talvez este comportamento seja devido à interação da FRC com os produtos de hidrólise do BAPA.

3.3.11 - Ação da FRC sobre a Atividade Hemoglobínica da Fração 25/50 de **Vigna unguiculata**

Finalmente, investigou-se a ação da FRC sobre a atividade homoglobínica da Fração 25/50. Os valores da TABELA 1 mostram que a FRC não age no sentido de inibir a atividade hemoglobínica da Fração 25/50.

3.4 - Caracterização da FRC por Métodos Eletroforéticos

3.4.1 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida a pH 8,1

A fração em estudo foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,1. A FIGURA 5 mostra uma banda bastante difusa correspondente a inibidores de tripsina revelados pelo método de URIEL & BERGES (1968). Por outro lado, o coramento com negro de amido mostrou a complexidade da FRC (FIGURA 6).

3.4.2 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS

A FRC foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS. Nestas experiências os cilindros de gel foram corados para a revelação de bandas de proteína, bem como para visualização de inibidores de tripsina. As FIGURAS 7 e 8 mostram os géis corados pelos dois métodos, respectivamente. A FRC mostra, como se vê, uma única banda correspondente a inibidores de tripsina, a qual apresenta peso molecular aparente de 8.000 daltons. A TABELA 2 mostra os pesos moleculares das diversas bandas reveladas por Coomassie Blue.

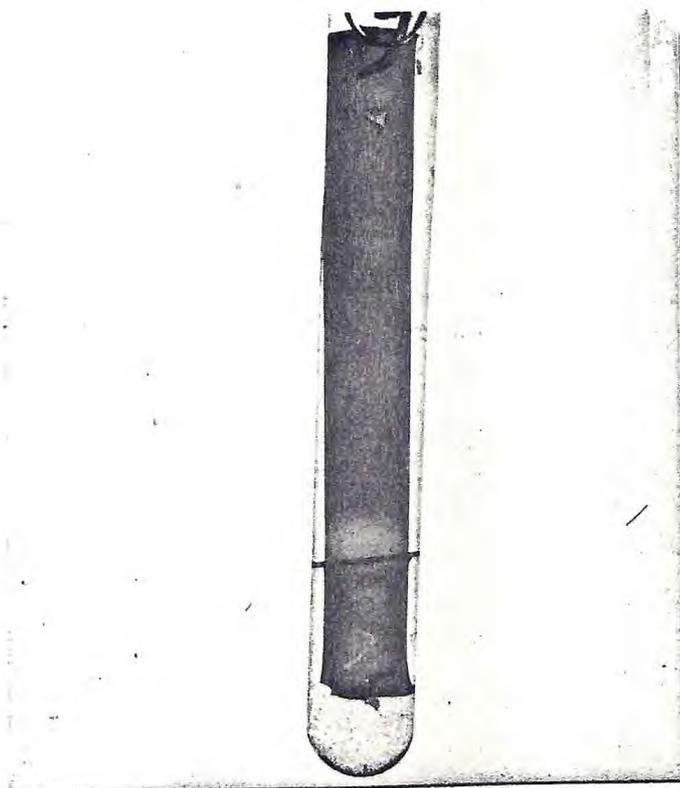


FIGURA 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,1 de uma amostra de FRC revelada por coramento negativo para inibidores de tripsina.



FIGURA 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida de uma amostra de FRC corada por negro de amido.

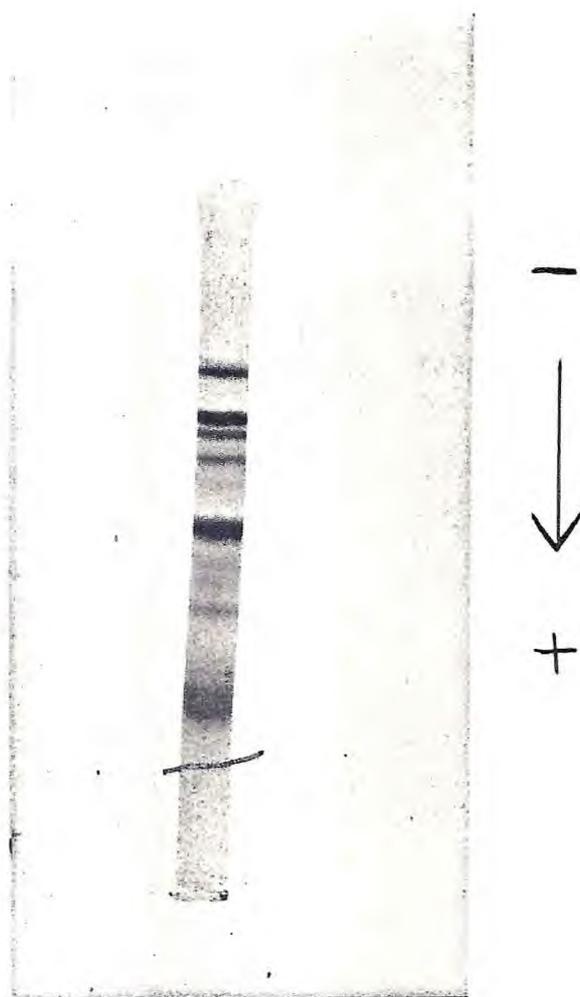


FIGURA 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS de uma amostra de FRC. Coramento por Coomassie Blue.

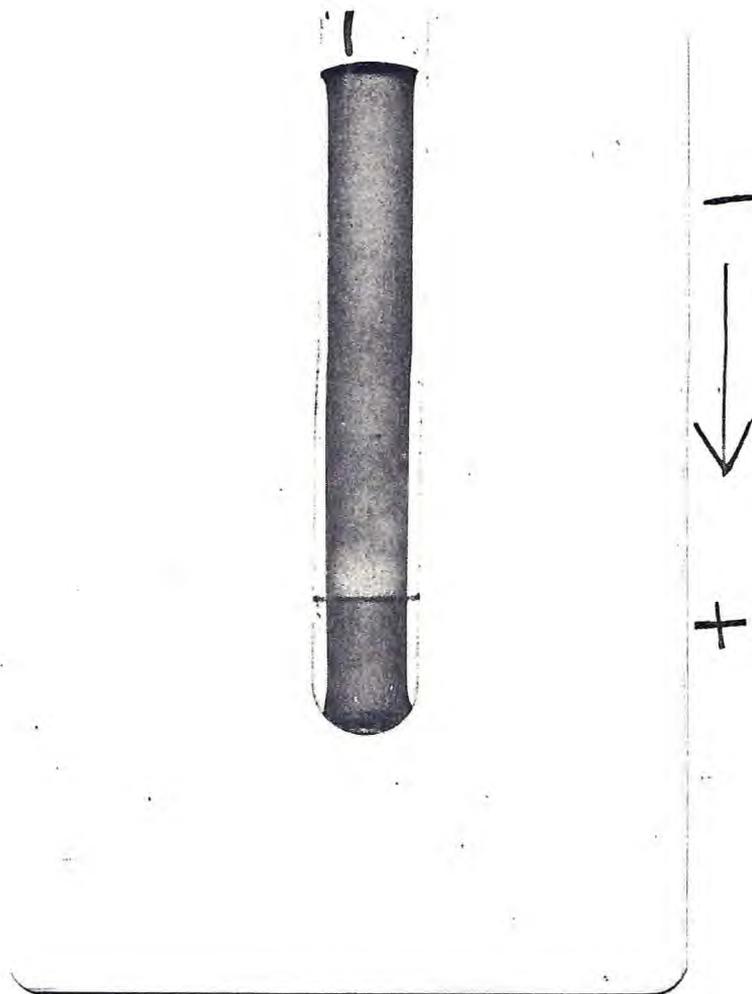


FIGURA 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS de uma amostra de FRC. Coramento negativo, revelação para inibidores de tripsina.

TABELA 2 - Pesos moleculares aparentes das bandas de proteína da FRC calculados por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS. Cada valor representa a média de quatro determinações.

Bandas	Peso Molecular (d)
1	8.000
2	17.000
3	20.000
4	21.000
5	25.000
6	31.000
7	33.000
8	38.000
9	41.000
10	49.000

3.5 - Caracterização da FRC por Métodos Cromatográficos

3.5.1 - Cromatografia em Sephadex G 100

A FRC foi também caracterizada por cromatografia em coluna de Sephadex G 100, tanto em tampão fosfato pH 7,6 como em tampão acetato pH 3,5. A FIGURA 9 mostra o perfil de eluição em Sephadex G 100, a pH 7,6. Observam-se cinco picos bem diferenciados que contrastam com apenas três do perfil de eluição a pH 3,5 (FIGURA 10), o que certamente se deve a um processo de associação dessas proteínas em pHs altos. O perfil de eluição da cromatografia em Sephadex G 100, a pH 7,6, foi usado como base para determinação dos pesos moleculares das diversas frações de acordo com o método de DETERMANN & MICHEL (1966). A TABELA 3 apresenta os pesos moleculares das frações eluídas em tampão fosfato pH 7,6.

As atividades inibitórias contra tripsina e quimiotripsina foram medidas nas frações de Sephadex G 100 a pH 7,6. Os resultados indicam que as frações S₃, S₄, e S₅ apresentam atividade anti-triptica e as frações S₄ e S₅ também possuem atividade anti-quimiotriptica (TABELA 3).

3.5.2 - Cromatografia de Troca Iônica em DEAE-Celulose

A FRC foi submetida a fracionamento por cromatografia de troca iônica em DEAE-Celulose. A FIGURA 11 representa o padrão de eluição da cromatografia em DEAE-Celulose utilizando tampão fosfato 0,005 M, pH 7,0 em gradiente salino de zero a 1,5 M de NaCl. As atividades anti-triptica e anti-quimiotriptica foram investigadas nas frações e determinadas as unidades de inibidor para as duas enzimas.

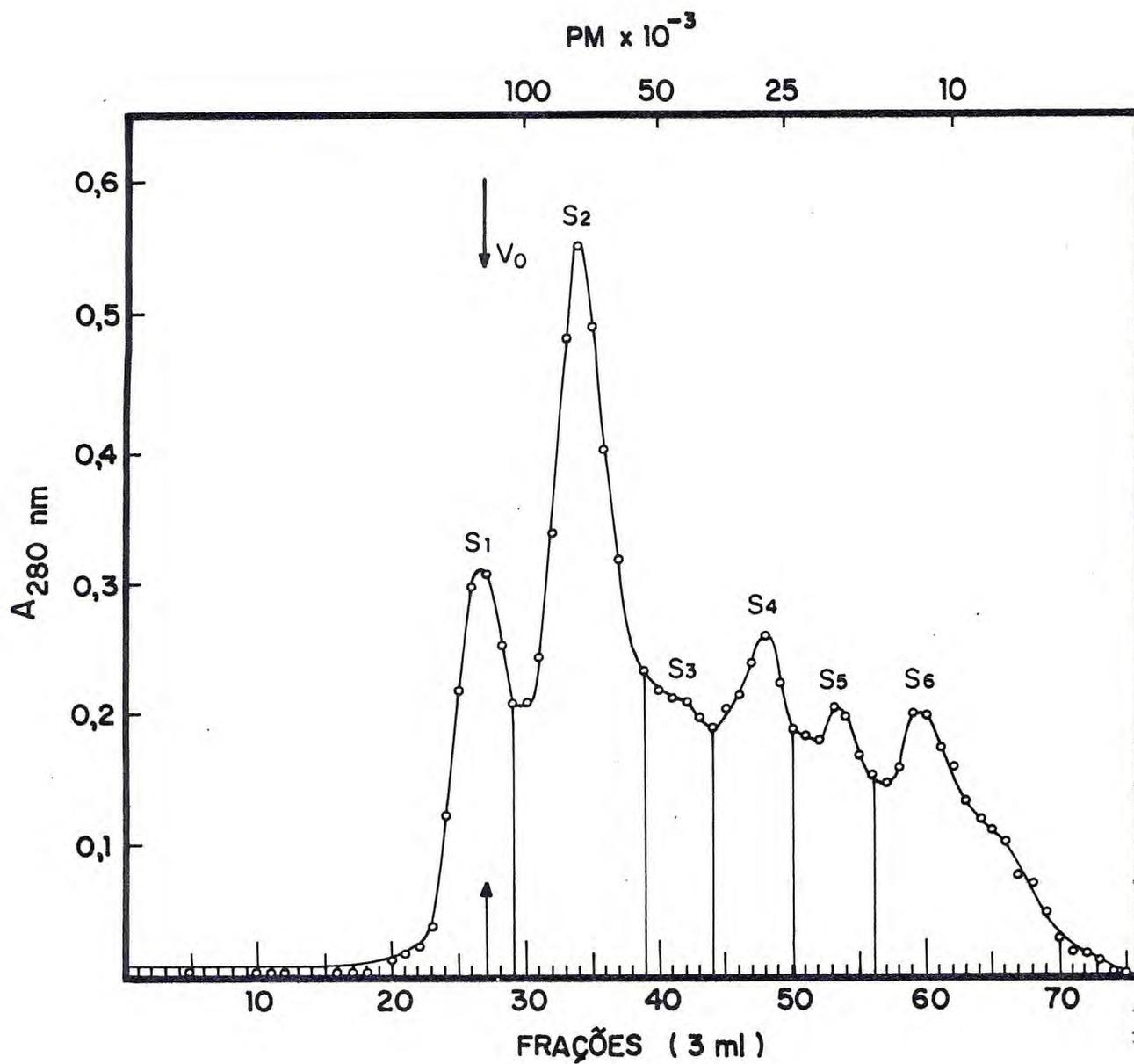


FIGURA 9 - Perfil de eluição da cromatografia em Sephadex G 100, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6. Amostra de 50 mg de FRC. Frações de 3 ml.

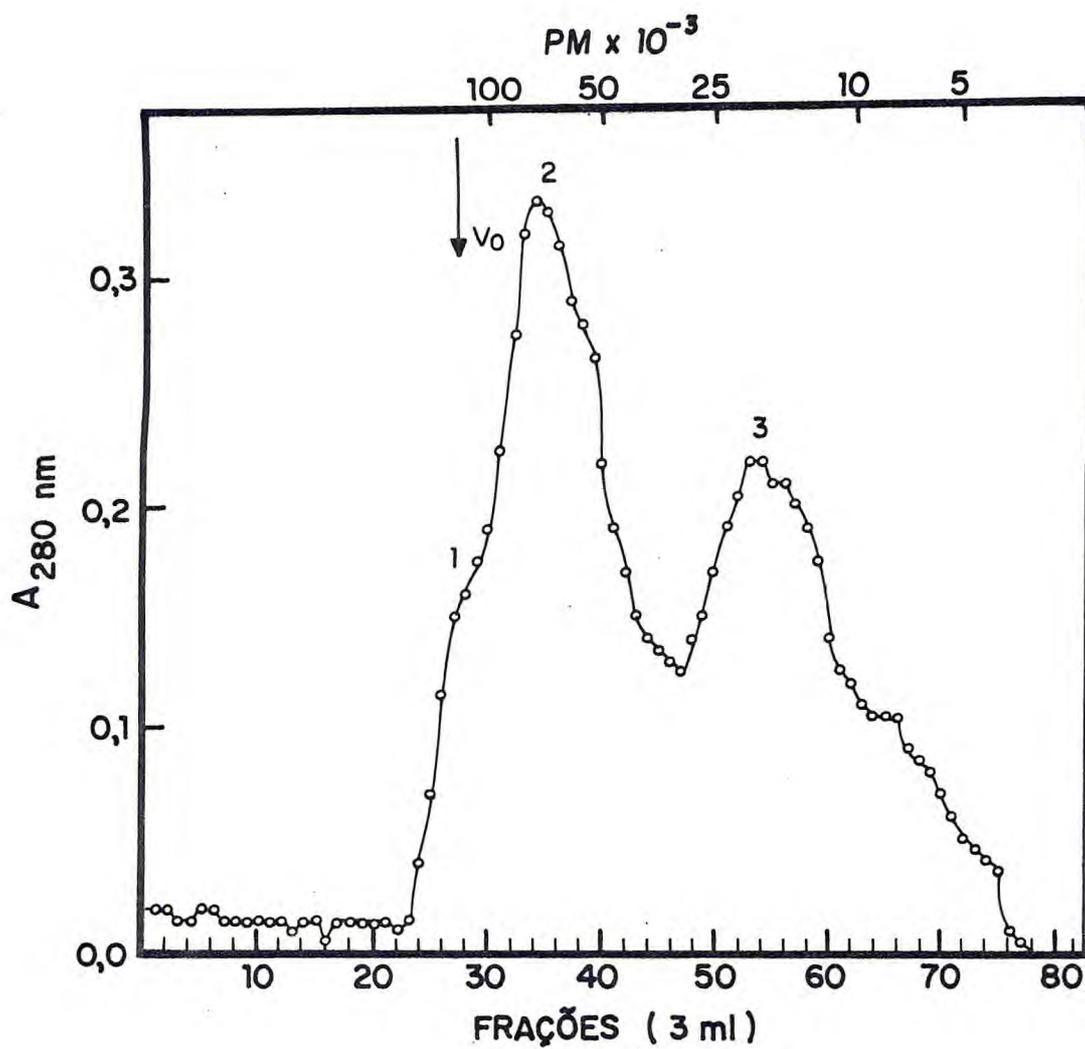


FIGURA 10 - Perfil de eluição da cromatografia em Sephadex G 100 em tampão acetato 0,1 M, pH 3,5. Amostra de 50 mg da FRC. Frações de 3 ml.

TABELA 3 - Pesos moleculares das Frações S₁, S₂, S₃, S₄, S₅ e S₆ da FRC, eluídas por cromatografia em Sephadex G 100, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6, mostrando as concentrações de inibidores de Tripsina e Quimiotripsina.

Frações	P.M. (daltons)	Ativ. Residual da Tripsina, %	Ativ. Residual da Quimiotripsina, %	UI _T /ml	UI _{QT} /ml
S ₁	107.000	93	100	-	-
S ₂	52.000	84	104	-	-
S ₃	36.000	8	104	248	-
S ₄	23.000	0	10	5913	1161
S ₅	15.000	25	29	1230	154
S ₆	6.000	95	100	-	-

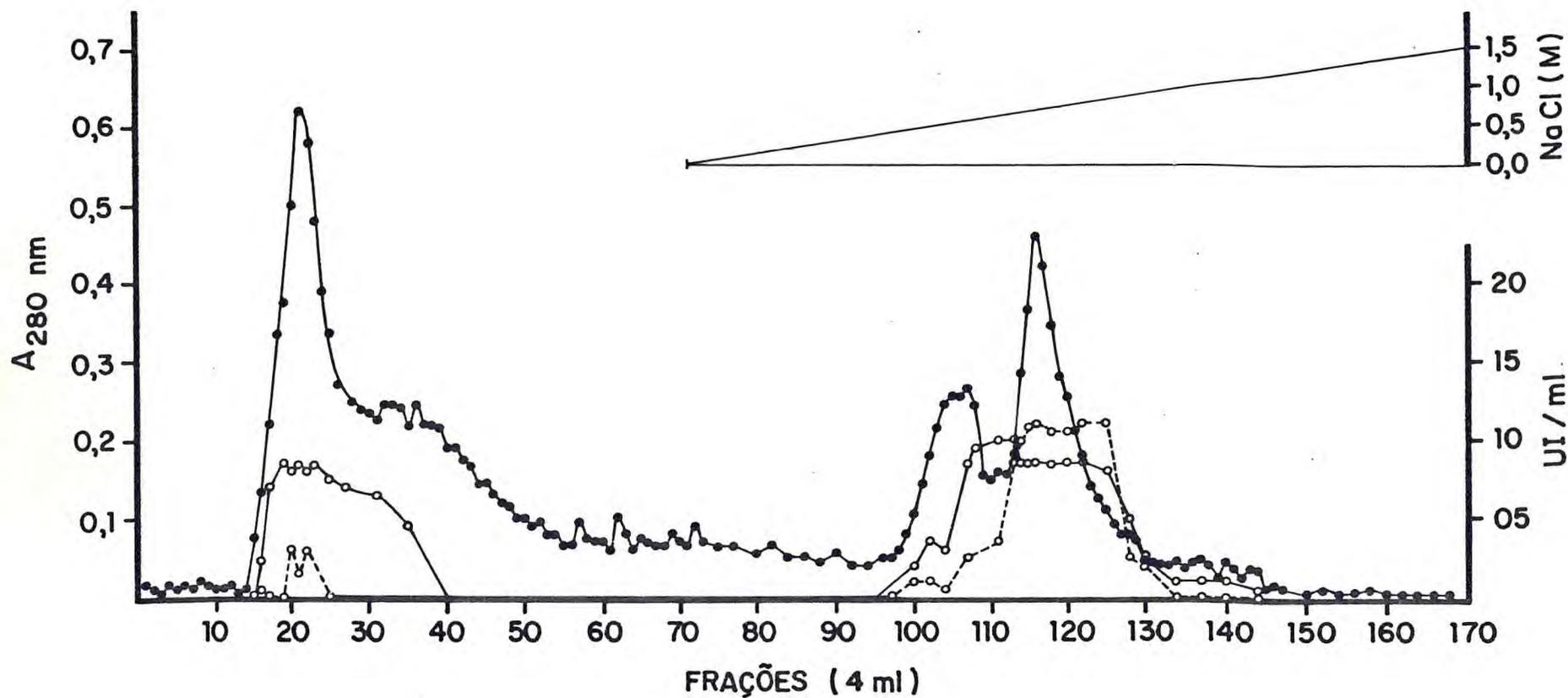


FIGURA 11 - Perfil de eluição de uma cromatografia em DEAE-celulose da FRC. Coluna 27cmx2cm; tampão de partida: fosfato 0,005 M, pH 7,0 seguido por gradiente linear de concentração salina (0 - 1,5 M; 400 ml); volume das frações: 4 ml

- A 280 nm ●—●
- UI de tripsina o—o
- UI de quimiotripsina o---o

3.6 - Eletrofocalização em Gel de Poliacrilamida

O exame da FRC por eletrofocalização em gel de poliacrilamida e coramento pelo método de URIEL E BERGES (1968) mostrou quatro bandas correspondentes a inibidores de tripsina (FIGURA 12).

Os pontos isoelétricos foram calculados encontrando-se os seguintes valores: 4,1; 4,7; 5,0; 5,3.

A FRC foi também examinada por eletrofocalização em placas de gel de poliacrilamida com coramento para proteínas (FIGURA 13) onde observamos cerca de 17 bandas cujos pontos isoelétricos são: 3,20 - 3,40 - 3,75 - 3,80 - 3,85 - 3,90 - 4,00 - 4,15 - 4,25 - 4,40 - 4,50 - 4,70 - 4,75 - 4,85 - 4,90 - 5,00 - 5,30.

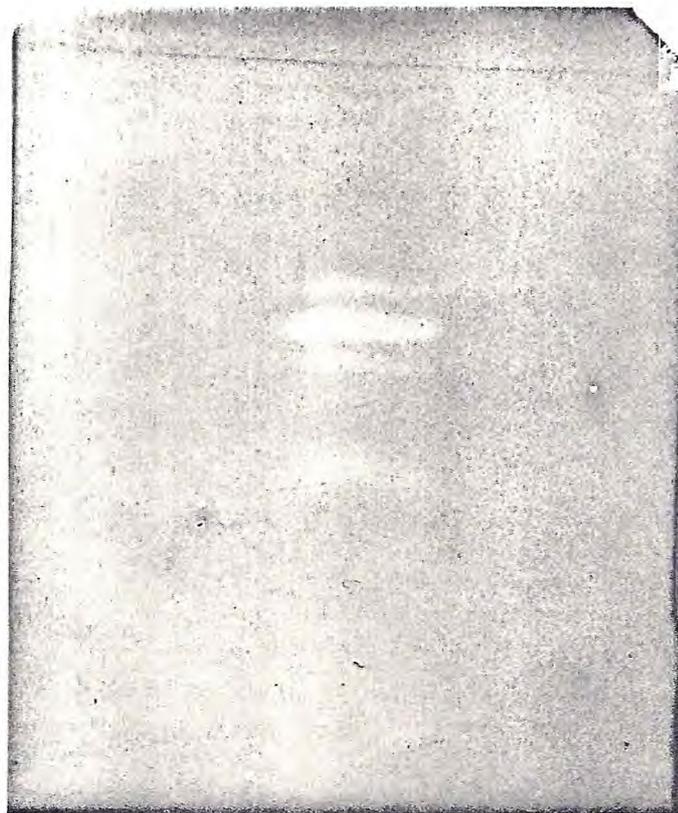


FIGURA 12 - Eletrofocalização em placas de gel de poliacrilamida da FRC. Revelação para inibidores de tripsina.

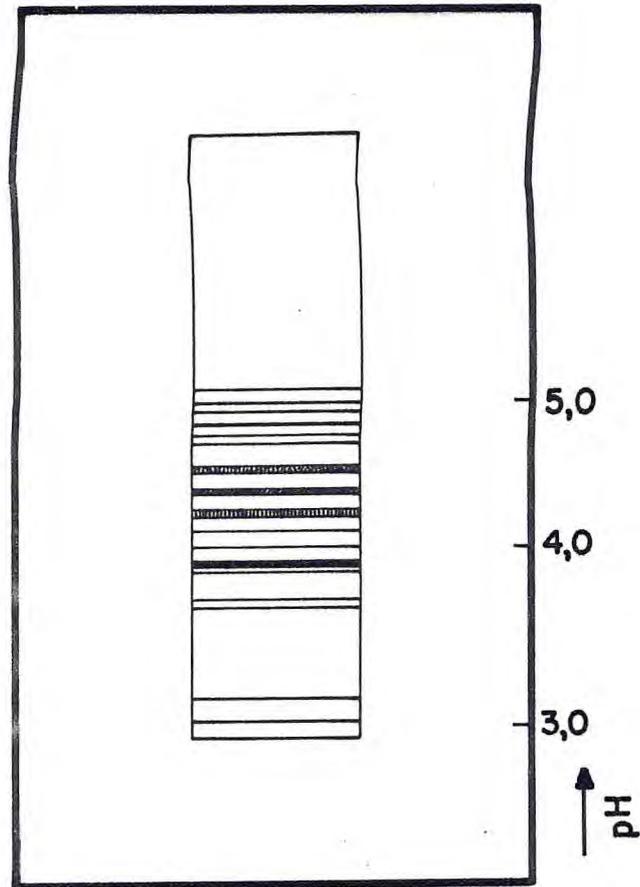


FIGURA 13 - Eletrofocalização em placas de gel de poliacrilamida da FRC; revelação para proteínas.

4 - DISCUSSÃO

A Fração Resistente ao Calor (FRC) isolada de sementes de **Vigna unguiculata** (L.) Walp. cv. Seridó, apresentou algumas propriedades diferentes daquelas do modelo proposto no início do trabalho, notadamente a extrema variabilidade do peso molecular de seus constituintes. Portanto, a suposição de que ela seria constituída de proteínas de baixo peso molecular teve que ser abandonada diante dos resultados obtidos com o fracionamento em gel de Sephadex e por sua caracterização por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (FIGURAS 7 e 8, TABELAS 2 e 3 respectivamente).

As frações da cromatografia em gel de Sephadex a pH 7,6, quando testadas para atividade anti-tripsina e anti-quimiotripsina, mostraram que os inibidores de **Vigna unguiculata** apresentam um peso molecular entre 15.000 e 36.000 daltons (TABELA 3), o que é compatível com os dados encontrados por VENTURA et al. (1971). Os experimentos para determinação de peso molecular da FRC também confirmaram a capacidade dos inibidores de se associarem formando dímeros, trímeros, etc. (RICHARDSON, 1977).

Os experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS para revelação de inibidores de tripsina apresentaram uma única banda com peso molecular aparente de 8.000 daltons, o que está de acordo com os resultados encontrados por GENNIS & CANTOR (1976). É provável que se trate de inibidores de dupla-cabeça, uma vez que o peso molecular e os resultados da DEAE-celulose demonstram a existência desses inibidores na fração em estudo.

Foram detectados apenas inibidores de tripsina bovina, tripsina porcina, quimiotripsina e pronase dentre as proteínases estudadas (FIGURAS 2, 3 e 4 e TABELA 1).

Os dados obtidos em relação a atividades inibitórias contra tripsina e quimiotripsina (FIGURAS 2, 3 e 4) re-

velaram que essas atividades inibitórias correspondem aos inibidores de tripsina e quimiotripsina previamente purificados por XAVIER FILHO e SOUZA (1979), VENTURA & XAVIER FILHO (1966). Mais uma vez os resultados confirmam a heterogeneidade dos inibidores de enzimas proteolíticas de **Vigna unguiculata** em termos de ponto isoelétrico, como mostra a FIGURA 13. Inclusive a cromatografia em DEAE-celulose refletiu a grande variedade de pontos isoelétricos encontrados nos experimentos de eletrofocalização.

A pronase, enzima da classe mecanística da tripsina, endopeptidase serínica, foi fracamente inibida pela FRC, talvez pela presença de baixa concentração de um inibidor específico. É importante ressaltar que todas as enzimas que foram inibidas pela FRC pertencem à classe das endopeptidases serínicas.

A não detecção de atividade inibitória contra papaína e subtilisina na FRC está em desacordo com os estudos prévios de VARTAK et al. (1980a,b) que mostraram a presença de iso-inibidores de subtilisina e papaína em **Vigna unguiculata**, tendo inclusive encontrado pesos moleculares variando entre 5.000 e 14.000 daltons, para esses inibidores (VARTAK et al. 1980c). Os inibidores de papaína de **Vigna**, particularmente o inibidor B₂ purificado por VARTAK, apresentam pontos isoelétricos elevados, o que contrasta com as características comuns aos inibidores de tripsina e subtilisina de **Vigna unguiculata**.

O fato de não haverem sido detectados, no presente trabalho, esses inibidores de papaína e subtilisina poderia ser explicado devido à perda desses inibidores durante o processo de purificação aqui empregado ou, mais provavelmente, ao fato desses inibidores estarem presentes em baixas concentrações na FRC e assim não poderem ser percebidos. A primeira hipótese não parece ser provável, uma vez que aqueles inibidores, tal como caracterizados por VARTAK, apresentam propriedades de PM, estabilidade ao calor e a tratamento com ácidos que os tornariam passíveis de serem isolados pelo método usado neste trabalho. Dessa maneira, a segunda hipótese

torna-se mais aceitável, uma vez que o grau de purificação usado para os inibidores A₁, A₂ e A₃ de papaína isolados por VARTAK e colaboradores foi em torno de 60.000 vezes e para B₂ foi de 15.000 vezes. Quanto aos inibidores de subtilisina, também isolados de **Vigna unguiculata** com um grau de purificação de 42.000, 48.000 e 21.000 vezes, reforçam a idéia de que não se detectaram essas atividades inibitórias na FRC devido à baixa quantidade desses inibidores presentes na fração.

A FRC também não afetou as atividades BAPA-ásica, caseinásica e hemoglobínica da F 25/50 isoladas de **Vigna unguiculata** cv. Seridó. Neste caso, é provável que a concentração desses inibidores seja muito baixa na semente e, conseqüentemente, não detectável pelo método empregado, ou que o processo de purificação da FRC tenha possibilitado de alguma forma a perda desses inibidores. Esse resultado não favorece a hipótese do controle de proteinases endógenas como possível papel biológico dos inibidores naturais de enzimas proteolíticas.

COELHO (1980) e LOPES (1985) detectaram atividade proteínica em extratos brutos de **Callosobruchus maculatus**. Essas atividades foram testadas em relação à inibição pela FRC. De acordo com os resultados obtidos, essas atividades não foram inibidas pela fração em estudo. A resistência da cultivar TVu 2027 de **Vigna unguiculata** ao ataque do gorgulho (**C. maculatus**) foi atribuída ao alto conteúdo de inibidores de tripsina nessa cultivar (GATEHOUSE *et al.*, 1979 e GATEHOUSE & BOULTER, 1983). A não inibição dessas atividades proteolíticas do gorgulho pela FRC indicaria que os inibidores de tripsina sozinhos não seriam os únicos responsáveis pela resistência, uma vez que essas atividades ácida e alcalina parecem ser as principais atividades proteínicas das larvas de gorgulho (LAW *et al.*, 1979).

A razão da toxicidade dos inibidores de tripsina para certos organismos ainda não foi devidamente esclarecida. Duas hipóteses igualmente prováveis podem ser levantadas. A primeira atribui a toxicidade à inibição do sistema proteolítico

tico do organismo que dele se alimenta. A segunda explica a toxicidade dos inibidores de tripsina a partir de sua indigestibilidade, já que eles são moléculas extremamente rígidas, com estruturas terciárias estabilizadas por pontes dissulfeto. Nesse contexto seria recomendável que se estudasse o efeito *in vivo* da FRC. Essa investigação poderia ser feita a partir da FRC livre dos inibidores de tripsina e quimiotripsina. Esses inibidores poderiam ser retirados da FRC por meio de cromatografia de afinidade. Caso o efeito tóxico se devesse apenas à sua indigestibilidade, certamente a ingestão da FRC livre de inibidores de tripsina e quimiotripsina provocaria os mesmos efeitos tóxicos dos inibidores de proteinase, dada a presença de componentes da FRC que compartilham, com os mesmos, de propriedades físico-químicas indicativas de resistência à hidrólise enzimática.

Os estudos aqui desenvolvidos levaram à caracterização parcial de uma fração resistente ao calor isolada de *Vigna unguiculata* bastante heterogênea em relação a peso molecular e ponto isoelétrico e muito rica em inibidores de proteinases. No entanto, fica clara a necessidade de uma caracterização mais extensiva da FRC, notadamente em relação à determinação do teor de cisteína e sua distribuição em relação aos pesos moleculares.

A aparente ausência de inibidores de proteinases outras que não tripsina bovina, tripsina porcina, quimiotripsina e pronase ainda precisa ser mais extensivamente investigada, preferencialmente a partir da fração de peso molecular entre 8.000 e 30.000 daltons (TABELA 2). A FRC ainda poderia ser testada quanto à presença de inibidores de enzimas não proteolíticas (α -amilase, lipase, etc.). Tal estudo seria desejável e poderia ser feito a partir das frações de peso molecular entre 8.000 e 30.000 daltons, que é a faixa característica dos inibidores de enzimas não proteolíticas, ou pelo menos dos inibidores de α -amilase (MARSHALL & LAUDA, 1975). A presença de um conteúdo de 2,25% de carboidrato na FRC parece sugerir a existência de inibidores de α -amilase nesta fração, uma vez que, tipicamente, esses inibidores apresen-

tam um conteúdo bastante significativo de carboidrato (MARSHALL & LAUDA, (1975)).

Investigações recentes sugerem a existência de uma classe de proteínas em sementes de oleaginosas que abrange de 20 a 60% da proteína total da semente e que, de um modo geral, guarda muita semelhança com as proteínas aqui estudadas (YOULE & HUANG, 1981). Denominadas de proteínas 2S, elas representam uma classe distinta que se caracteriza por apresentar baixo peso molecular, alta solubilidade em água, alto conteúdo de cisteína em adição a um extremamente alto conteúdo de nitrogênio. Estas proteínas, apesar de possuírem baixa ou nenhuma ação anti-enzimática, são notadamente pertencentes à classe de proteína estudada neste trabalho. Neste aspecto, discorda-se pois das postulações de YOULE e HUANG que claramente excluem os inibidores de proteinases dessa classe de proteína, considerando-os apenas contaminantes das suas preparações, uma vez que as diferenças na composição de aminoácidos seriam muito acentuadas. Dentro dessa ótica, seria interessante determinar a composição de aminoácidos da FRC com o intuito de melhor investigar essa questão. Devido à grande riqueza de aminoácidos sulfurados nas proteínas 2S elas teriam como principal papel biológico a constituição de reserva especial de nitrogênio e enxofre que seria mobilizada durante a germinação para a síntese de outras proteínas, cofatores, enzimas, etc. papel biológico atribuído por PUSZTAI (1967) para os inibidores de proteinases de plantas.

Os resultados aqui discutidos parecem reforçar a hipótese de que os inibidores de proteinases estão incluídos em uma classe de proteínas que apresentam algumas propriedades físico-químicas comuns. Embora esses resultados não sejam conclusivos, eles estão em consonância com a proposta de KREIS, M. e colaboradores (1984) que sugerem a existência de uma superfamília de proteínas de sementes onde estão incluídas algumas prolaminas de trigo, cevada e centeio, inibidores de tripsina e α -amilase de cereais, inibidores tipo Bowman-Birk e as globulinas 2S. O critério usado para o estabelecimento desta superfamília de proteínas de sementes to

ma por base a presença de domínios homólogos entre seus membros.

Seria oportuno sugerir a continuidade do presente trabalho, investigando a capacidade da FRC de inibir outras enzimas, a sua ação *in vivo*, a sua composição de aminoácidos e sua resistência a proteólise, entre outras propriedades.

5 - CONCLUSÕES

- 1 - A Fração Resistente ao Calor (FRC) contém 17,2% de nitrogênio total e 2,25% de carboidrato.
- 2 - O peso molecular aparente das proteínas constituintes da FRC, determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, varia de 8.000 a 49.000 daltons e por filtração em gel de Sephadex G 100 varia de 6.000 a 107.000 daltons.
- 3 - O peso molecular aparente determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS da banda da FRC que apresenta atividade anti-trípica é de 8.000 daltons.
- 4 - Os pontos isoelétricos das proteínas que compõem a FRC variam de 3.2 a 5.3.
- 5 - Os pontos isoelétricos dos inibidores de tripsina presentes na fração são os seguintes: 4,1; 4,7; 5,0; 5,3.
- 6 - A FRC inibe tripsina bovina, tripsina porcina, quimiotripsina e pronase.
- 7 - A FRC não inibe pepsina, subtilisina BPN', papaína, azocaseinase ácida e alcalina de *C. maculatus*, BAPA-ase da F 25/50, caseinase da F 25/50 e hemoglobinas da F 25/50 de *Vigna unguiculata*.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, C.A. and RINNE, R.W. The occurrence and significance of dispensable proteins in plants. **New Phytol.** **89**:1-14, 1981.
- AINOUZ, I.L., BENEVIDES, N.B. and FREITAS, A.L.P. Proteolytic activities in seeds of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Biol. Plant.** **23(2)**:133-140, 1981.
- ARNON, R. Papain in **Methods in Enzymology XIX**:226-224. Academic Press, New York, 1970.
- AWDEH, Z.I., WILLIAMSON, A.R. and ASKONAS, B.A. Isoelectric focusing polyacrylamide gels and its application to immunoglobulins. **Nature**, **219**:66-67, 1968.
- BAUMGARTNER, B. and CHRISPPEELS, M.J. Partial characterization of a protease inhibitor which inhibits the major endopeptidase present in the cotyledons of mung beans. **Plant. Physiol.** **58**:1-6, 1976.
- BEEVERS, L. Protein degradation and proteolytic activity in the cotyledons of germinating pea seeds (*Pisum sativum*). **Phytochemistry**, **7**:1837-1844, 1968.
- CAMPOS, F.A.P. and RICHARDSON, M. The complete amino acid sequence of the bifunctional alfa-amylase/trypsin inhibitor from seeds of ragi (Indian finger millet, *Eleusine coracana* Gaertn.). **FEBS Lett.** **152(2)**:300-304, 1983.
- CLARKE, J.T. A simplified "disc" (polyacrilamide gel) electrophoresis. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** **121**:428-436, 1964.
- COELHO, A.N. **Relação entre o sistema proteolítico de *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) e inibidores de enzimas proteolíticas de *Vigna sinensis* (L.) Savi.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará, 1980.
- DETERMANN, H. and MICHEL, W. The correlation between molecular

- weight and elution behavior in the gel chromatography of proteins. **J. of Chromatog.** **25**:303-313, 1966.
- DUBOIS, M., GILES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. and SMITH, F. Coorimetric method for determination of sugar and related substances. **Anal. Chem.** **28(3)**:350-356, 1956.
- ERLANGER, B.F., NICHOLAS, K. and WILLIAMS, C. The preparation of two chromogenic substrates of trypsin. **Arch. Biochem. Biophys.** **95**:271-278, 1961.
- GATEHOUSE, A.M.R. GATEHOUSE, J.A., DOBIE, P., KILMINSTER, A. M. and BOULTER, D. Biochemical basis of insect resistance in *vigna unguiculata*. **J. Sci. Food Agric.** **30**:948-958, 1979.
- GATEHOUSE, A.M.R. and BOULTER, D. Assesement of the antimetabolic effects of trypsin inhibitors from cowpea (*Vigna unguiculata*) and other legumes on the development of the bruchid beethe *Callosobruchus maculatus*. **J. Sci. Food Agric.** **34**:345-350, 1983.
- GENNIS, L.S. and CANTOR, C.R. Double-headed protease inhibitors from black-eyed peas I. Purification of two new protease inhibitors and the endogeneous protease by affinity chromatography. **J. Biol. Chem.** **251**:734-740, 1976.
- GOAD, L.J. **The development of amylase and protease activity in germinating wheat**, Ph.D. Thesis. Univ. of Manchester, 1963.
- HAGIHARA, B., MATSUBARA, H., NAKAI, M., KOMAKI, T., YONETANI, T. and OKUNUKI, K. Chrystalline bacterial proteinase. II. General properties of chrystalline proteinase of *Bacillus subtilis* N'. **J. Biochem.** **45(4)**:251-258, 1958b.
- HABIHARA, B., MATSUBARA, H., NAKAI, M. and OKUNUKI, K. Chrystalline bacterial proteinase. I. Preparation of chrystalline proteinase of *Bacillus subtilis* N'. **J. Biochem.** **45(3)**:185-194, 1958a.
- HIGGINS, T.J.V. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. **Ann. Rev. Plant Physiol.** **35**:191-221, 1984.
- HILLER, A., PLAZIN, J. and SLYKE, D.V. A study of conditions for Kjeldahl determination of nitrogen in proteins. **J. Biol. Chem.** **176**:1401-1420, 1948.
- JAFFÉ, W.C., MORENO, R. and WALLIS, V. Amylase inhibitors in legume seeds. **Nutrit. Reports Internat.** **7**:169, 1973.

- KAISER, K.P. and BELITZ, H.D. Proteinaseinhibitoren in lebensmitteln Vorkommen in isolierung von trypsin and chymotrypsininhibitoren in paintoffeln. **Chem. Mikrobiol. Lebens.** 1:1-7, 1971.
- KAKADE, M.L. Biochemical basis for the differences in plant protein utilization. **J. Agr. Food Chem.** 22(4):550-55, 1974.
- KREIS, M. e colaboradores. Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye, and wheat. Manuscrito submetido a publicação. 1984.
- KUNITZ, M. Chrystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties **J. Gen. Physiol.** 30:291-310, 1947.
- LASKOWSKI, M. and KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Ann. Rev. Biochem.** 49:593-626, 1980.
- LAW, J.H., DUNN, P.E. and KRAMER, K.J. Insect protease and peptidases **in Adv. Enzymol.** 45:389-425, 1979.
- LIENER, I.E. and KAKADE, M.L. Protease inhibitors **in** LIENER, I.E., ed; Toxic constituents of plants foodstuffs. pp. 7-71, 2nd. ed. Academic Press, New York, 1980.
- LOPES, A.L.S. **Estudo do sistema proteolítico de Callosobruchus maculatus (Fabr.)(gorgulho de feijão) durante seu desenvolvimento.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 1985.
- LOWRY, O.H., RAERBROUGH, M.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. Protein mesurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193:265-275, 1951.
- MAIA, G.M.C. Inibidores de Tripsina em **Adenantha pavonina**, L. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará, 1982.
- MARSHALL, J.J. and LAUDA, C.M. Purification and properties of phaseolamin, and inhibitor of α -amylase from Kidney bean, **Phaseolus vulgaris**. **J. Biol. Chem.** 250(20):8030-8037, 1975.
- NARAHASHI, Y. Pronase, **in Methods in Enzimology XIX**:651-664, Academic Press, N. York, 1970.
- PUSZTAI, A. Trypsin inhibitor of plant origin, their chemistry and potential role in animal nutrition. **Nutr. Abst. Rev.** 37:1-9, 1967.

- RICHARDSON, M. The proteinase inhibitors of plant and microorganisms. *Phytochemistry* **16**:159-169, 1977.
- RYAN, C.A. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **24**:173-196, 1973.
- RYAN, C.A. **Herbivores: their interactions with metabolites.** Ed. Rosenthal, G.A. and Jansen, D.H., pp. 599-618, New York, 1979.
- RYAN, C.A. Proteinase inhibitors. *The Biochem. of Plants* **6**: 351-370, Marcus, E. Ed., Academic Press, New York, 1981.
- TAN-WILSON, A.L. and RIGHTMIRE, B.R. and WILSON, K.A. Different rates of metabolism of soybean proteinase inhibitors during germination. *Plant Physiol.* **70**:493-497, 1982.
- URIEL, J. and BERGES, J. Characterization of natural inhibitors of trypsin and chymotrypsin by electrophoresis in acrylamide - agarose. *Nature* **218**:578-580, 1968.
- VARTAK, H.G. MECNAKSHI, V.R. and JAGANNATHAN, V. Proteinase inhibitors from *Vigna unguiculata* subsp. *cylindrica*. I. Occurrence of thiol proteinase inhibitors in plants and purification from *Vigna unguiculata* subsp. *cylindrica*. *Arch. Biochem. Biophys.* **204**(1):117-128, 1980.
- VARTAK, H.G. BOOHE, A.M. PARANJPE, S.V. and JAGANNATHAN, V. Proteinase inhibitors from *Vigna unguiculata* subsp. *cylindrica*. II. Inhibitors of subtilisin and trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* **204**:129-133, 1980.
- VARTAK, H.G., MEENAKSHI, V.R. and JAGANNATHAN, V. Proteinase inhibitors from *Vigna unguiculata* subsp. *cylindrica*. III. Properties and kinetics of inhibitors of papain, subtilisin and trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* **204**(1):134-140, 1980.
- VENTURA, M.M. et al. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vigna sinensis*, L). II. Further studies on its characterization and a reevaluation of earlier results. *An. Acad. Bras. Cienc.* **43**(1), 1971.
- VENTURA, M.M. and XAVIER FILHO, J. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vigna sinensis*) I. Purification and partial characterization. *An Acad. Bras. Cienc.* **38**:553-565, 1966.

- XAVIER FILHO, J. Trypsin inhibitors in sorghum grain. *J. Food Sci.* **39**:442-426, 1974.
- XAVIER FILHO, J. and MOREIRA, R.A. Visualization of proteinase inhibitors in SDS - polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **84**:296-303, 1978.
- XAVIER FILHO, J. and SOUZA, F.D.N. Isolation and characterization of a trypsin inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. *Biol. Plant.* **21**:119-126, 1979.
- XAVIER FILHO, J. **Estudos sobre inibidores de Tripsina em plantas.** Tese para concurso de Professor Titular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 1980.
- XAVIER FILHO, J. e CAMPOS, F.A.P. Inibidores de enzimas proteolíticas em plantas. *Arq. Biol. Tecnol.* **27(3)**:407-418, 1984.
- XAVIER FILHO, J., SERRA LOPES, A.L., AINOUS, I.A. Inibidores de proteases e a resistência de feijão de corda (*Vigna unguiculata*) ao gorgulho (*Callosobruchus maculatus*). **Caderno de Resumos da III Reunião regional do Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica.** Natal - Rio Grande do Norte, 1984.
- YOULE, R.J. and HUANG, A.H.C. Occurrence of low molecular weight and high cysteine containing albumin storage proteins in oilseeds of diverse species. *Amer. J. Bot.* **68**:44-48, 1981.
- WEBER, K. and OSBORNE, M. The reliability of molecular weight determinations by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**:4406-4412, 1964.