

MOBILIZAÇÃO DE INIBIDORES DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS DE
VIGNA SINENSIS (L) Savi cv. Seridô

André Newton do Monte Negreiros

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários
à obtenção do grau de
MESTRE EM BIOQUÍMICA

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

1 9 7 8

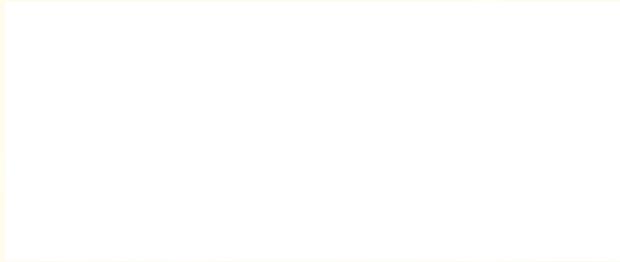
Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da Universidade.

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

André Newton do Monte Negreiros

DISSERTAÇÃO APROVADA POR:

José Xavier Filho	29.08.1978
Orientador da Dissertação	Data
Renato de Azevedo Moreira	29.08.1978
	Data
Iracema Lima Ainouz	29.08.1978
	Data



A minha mulher,
a meus filhos
e a meus pais.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. José Xavier Filho, cujos profundos conhecimentos científicos se amoldam e se combinam a uma exegese invulgar, o meu mais sincero reconhecimento pelas memoráveis lições recebidas.

Ao Prof. Renato de Azevedo Moreira, a cujo incentivo e apoio devo a solução de difíceis problemas de ordem científica, a certeza de que saberei sempre lembrar os seus ensinamentos.

À Prof^a. Iracema Lima Aínouz, a cuja acuidade e capacidade de resolução rendo o meu mais sincero reconhecimento.

À Prof^a. Vera Augusta Nepomuceno, do Departamento de Biologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, por suas importantes sugestões durante diversas fases de elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Gilberto Marques do Vale, do Departamento de Comunicação e Biblioteconomia da Universidade Federal do Ceará, pela execução do trabalho fotográfico apresentado nesta dissertação.

Ao Prof. Alcir Leopoldo Dias da Silveira, filólogo eminente, professor dedicado, amigo sincero, meu reconhecimento pelo trabalho de revisar o vernáculo.

À Escola Superior de Agricultura de Mossoró e a seu Diretor Prof. Jerônimo Vingt-Un Rosado Maia, pela oportunidade de execução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de Pós-graduação concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível

Superior (CAPES/CID), pela bolsa de Pós-graduação concedida e pelo Convênio com o curso de Pós-graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

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

Aos colegas de curso, pelos constantes gestos de solidariedade, cooperação e incentivos.

ÍNDICE

	Página
I - INTRODUÇÃO.....	1
II - MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
A - MATERIAIS.....	8
B - MÉTODOS.....	9
1. Condições de germinação.....	9
2. Preparação dos extratos.....	9
3. Determinação de peso fresco.....	12
4. Determinação de peso seco.....	12
5. Determinação de proteínas.....	12
6. Determinação de proteinases e inibidores... ..	15
a. Tripsina.....	15
b. Quimiotripsina.....	15
c. Atividade inibitória.....	16
7. Detectação de inibidores de tripsina e qui- miotripsina em cortes transversais de coti- lédones de feijão de corda cv. seridô.....	16
a. Preparação do filme de gel agar.....	16
b. Preparação dos cortes de cotilédones....	17
c. Contacto dos cortes de cotilédones com o gel de agar.....	17
8. Diafanização de cotilédones para identifica- ção da disposição das nervuras cotiledoná- rias.....	18

	Página
9. Identificação dos feixes vasculares em cortes transversais de cotilédones de feijão de corda cv. seridó..	18
10. Detecção de proteínas em cotilédones de feijão de corda cv. seridó..	19
III - RESULTADOS.....	20
1. Determinação de peso fresco e de peso seco.....	20
2. Determinação de proteínas.....	20
3. Inibidores de tripsina.....	28
4. Inibidores de quimiotripsina.....	34
5. Disposição das nervuras cotiledonárias.....	44
6. Distribuição de proteínas.....	52
7. Mobilização transversal de inibidores.....	52
IV - DISCUSSÃO.....	57
V - CONCLUSÕES.....	62
VI - BIBLIOGRAFIA.....	63

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

Tabela	Página
I. Pesos frescos e secos das secções cotiledonárias, eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas.....	21
II. Atividades inibitórias da tripsina.....	26
III. Atividades inibitórias da quimiotripsina.....	39
Figura	
1. Padronização dos cotilédones em direito e esquerdo...	10
2. Padronização das secções cotiledonárias	11
3. "Guilhotina", vista de frente.....	13
4. "Guilhotina", vista lateral.....	14
5. Pesos frescos das secções cotiledonárias.....	22
6. Pesos secos das secções cotiledonárias.....	23
7. Pesos frescos do eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas.....	24
8. Pesos secos do eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas.....	25
9. Concentrações de proteínas das secções cotiledonárias	27
10. Concentrações de proteínas do eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas.....	29
11. Inibidores de tripsina das secções cotiledonárias....	30
12. Concentrações de inibidores de tripsina referidas a peso fresco das secções cotiledonárias.....	31
13. Concentrações de inibidores de tripsina referidas a peso fresco do eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas.....	32
14. Atividade específica dos inibidores de tripsina das secções cotiledonárias.....	33
15. Inibidores de tripsina do eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas.....	35
16. Concentrações dos inibidores de tripsina referidas a peso fresco do eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas.....	36

Figura	Página
17. Concentrações dos inibidores de tripsina referidas a peso seco do eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo - plúmulas.....	37
18. Atividade específica dos inibidores de tripsina do eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas.....	38
19. Inibidores de quimiotripsina das secções cotiledonárias.....	40
20. Concentrações dos inibidores de quimiotripsina referidas a peso fresco das secções cotiledonárias.....	41
21. Concentrações dos inibidores de quimiotripsina referidas a peso seco das secções cotiledonárias.....	42
22. Atividade específica dos inibidores de quimiotripsina das secções cotiledonárias.....	43
23. Inibidores de quimiotripsina do eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas.....	45
24. Concentrações dos inibidores de quimiotripsina referidas a peso fresco do eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas.....	46
25. Concentrações dos inibidores referidas a peso seco do eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas...	47
26. Atividade específica dos inibidores de quimiotripsina do eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas	48
27. Cotilédone diafanizado.....	49
28. Disposição dos feixes vasculares em cortes transversais de cotilédones.....	50
29. Mobilização de proteínas em cortes transversais de cotilédones.....	53
30. Mobilização dos inibidores de tripsina em cortes transversais de cotilédones.....	54
31. Mobilização dos inibidores de quimiotripsina em cortes transversais de cotilédones.....	55

ABREVIATURAS

IT	- Inibidores de tripsina
IQ	- Inibidores de quimiotripsina
TCA	- Ácido tricloroacético
UI	- Unidades de inibidor
UIT	- Unidades de inibidores de tripsina
UIQ	- Unidades de inibidores de quimiotripsina
SP	- Secção proximal
SM	- Secção mediana
SD	- Secção distal
HR	- Hipocótilo-radícula
EP	- Epicótilo-plúmulas
HR+EP	- Somatório dos resultados obtidos para o hipocótilo-radícula com os resultados do epicótilo-plúmulas
APNE	- Acetil - DL - fenilalanina - β - naftil - ester

SUMÁRIO

O estudo da mobilização dos inibidores de proteases em cotilédones e plântulas de *Vigna sinensis* (L) Savi cv. seridô é uma etapa necessária à compreensão do papel que essas substâncias exercem durante a germinação. Utilizando o ensaio caseinolítico de Kunitz, conseguimos mostrar a existência, em cotilédones, embebidos por 4 horas, de um gradiente de inibidores de tripsina e quimiotripsina que cresce da porção distal para a proximal. Este gradiente parece ser desfeito ao fim de 24 horas, provavelmente em decorrência de uma solubilização dos inibidores em todo o cotilédone devida à destruição de complexos formados durante o desenvolvimento. Esta solubilização parece ser mais intensa na porção distal. A partir de 24 horas, o desaparecimento dos inibidores se dá com maior rapidez na porção proximal do que na distal. Observações feitas no eixo embrionário mostram que a concentração destas substâncias decresce nas primeiras 24 horas com velocidades bastante maiores do que as observadas na porção proximal quando em fase ativa de utilização, isto é, entre 24 a 72 horas. Por outro lado, em secções medianas de cotilédones, mostramos que a utilização dos inibidores está praticamente completa ao fim de sete dias e que sua mobilização se dá, provavelmente, através da nervura principal. Os inibidores desaparecem também por completo no hipocótilo-radícula, mas, entre 72 e 120 horas, parece haver síntese no epicótilo-plúmulas. Os resultados acima parecem indicar que o papel exercido pelos inibidores não seria restrito ao de proteínas de reserva rapidamente utilizadas, o que parece ocorrer no eixo embrionário nas primeiras 24 horas e com menor intensidade na porção proximal do cotilédone. Os dados nos sugerem também que os inibidores poderiam exercer um papel de protetores ou inibidores de proteases endógenas ou ambos, sendo estes complexos desativados quando as enzimas fossem chamadas a exercer suas funções.

I. INTRODUÇÃO

Nas sementes de todas as leguminosas e gramíneas até hoje examinadas, ocorrem substâncias proteicas capazes de inibir as atividades das enzimas proteolíticas animais, tripsina e quimiotripsina (1, 2, 3). Nas solanáceas e em inúmeras espécies de outras famílias, a presença destas substâncias foi também comprovada (4, 5, 6).

A totalidade dos inibidores encontrados em plantas até agora estudadas tem peso molecular abaixo de 50.000 daltons e, mais comumente, abaixo de 20.000 daltons. Inibidores de milho, batata e de muitos legumes têm peso molecular mínimo abaixo de 10.000 daltons, podendo estar associados como dímeros ou tetrâmeros (4, 7, 8, 9, 10, 11).

A maioria dos inibidores de enzimas proteolíticas tem alta percentagem de cistina apresentando inúmeras ligações -S-S-, o que confere a estas substâncias considerável resistência a agentes desnaturantes (12, 13). Todos eles contêm prolina e, em alguns casos, foi detectada a presença de triptofano (14).

Os inibidores ligam-se às enzimas através de seus centros ativos, formando complexos muito estáveis (4). Os centros ativos dos inibidores de tripsina contêm sempre uma ligação Arg-X ou Lis-X (5, 13), enquanto que os de quimiotripsina têm normalmente uma ligação Leu-X (4), sendo isto aparentemente reflexo das especificidades das enzimas.

Em sementes de soja, os inibidores acham-se concentrados nos cotilédones, existindo pequena atividade no eixo, não sendo detectada atividade nos tecidos vegetativos. Birk e Waldman (citado em 4) verificaram que, durante a maturação, os inibidores de soja aumentam de concentração, indicando um possível papel de reserva proteica.

Os inibidores de proteinases de solanáceas não são confinados apenas aos órgãos de reserva - os tubérculos. Também são encontrados nas raízes, brotos, caules, folhas e tecidos aéreos. Sua presença, em todos os casos, parece ser transitória, indicando um possível papel de reserva tem-

porária (4).

Shain e Mayer (citado em 4), fazendo estudos em sementes de alfaca, mostraram haver um decréscimo na concentração de inibidores após a germinação. O mesmo fenômeno foi observado no milho (9), no qual os inibidores começam a desaparecer durante a embebição, continuando o processo durante a germinação. Resultados semelhantes foram obtidos por Kirsi e Mikola (15), estudando sementes de cevada. Eles verificaram que toda a atividade inibitória tinha desaparecido do endosperma, após os quatro primeiros dias de germinação.

Inibidores de proteinases de *Vigna unguiculata* (16, 17) e de *Vigna sinensis* (18) acham-se concentrados nos cotilédones, existindo ainda atividades no eixo e na cobertura epidérmica. Xavier Filho, trabalhando em cotilédones de *Vigna sinensis*, mostrou que a atividade inibitória permanece praticamente constante até o terceiro dia de germinação, quando então decresce rapidamente, ficando o processo de metabolização desses inibidores quase que inteiramente completado até o sétimo dia de germinação.

Apesar do relevante papel desempenhado pelos legumes na dieta humana, é importante notar que os mesmos contêm uma variedade de substâncias consideradas como tóxicas para os animais, tais como: hemaglutininas, glicosídeos cianogênicos, fatores bociogênicos, inibidores de tripsina, etc. (19). Talvez os mais conhecidos desses fatores sejam os inibidores de tripsina. Entretanto, a maioria desses fatores antinutricionais é destruída parcial ou totalmente pela aplicação do calor (19). O efeito benéfico do calor, manifestado pelo aumento geral do valor nutritivo dos legumes, foi primeiramente observado no feijão soja e posteriormente confirmado e estendido a muitas outras espécies (20). Em geral, o grau de aumento do valor nutritivo efetuado no tratamento pelo calor depende da temperatura, umidade e duração do tratamento (19). Outras maneiras de eliminar a toxicidade parcial ou total dos inibidores fazem-se através de suplementação de enzimas proteolíticas à dieta, através de preparações fermentadas, através da eliminação dessas proteínas e através da utilização de sementes germinadas (19).

Além de sua importância bioquímica e nutricional, os inibidores têm-se tornado um instrumento importante de estudo nos campos médicos e biológicos. Eles têm interesse particular devido a seu potencial terapêutico, controlando proteinases em inúmeras doenças como na pancreatite, nos choques metabólicos e enfisemas (4). Ultimamente, os inibidores têm sido estudados como agentes reguladores da fertilização dos mamíferos (4). O interesse dos biólogos pelos inibidores deve-se à comprovação das similaridades estruturais e de especificidades existentes entre os inibidores obtidos de diferentes fontes vegetais, fato que indica que o centro ativo dessas biomoléculas pode ter sido conservado durante milhões de anos de evolução, o que sugere ser a capacidade inibitória importante para a sobrevivência do organismo.

Os trabalhos sobre isolamento, estrutura e interações existentes entre inibidores de plantas e enzimas proteolíticas de animais foram iniciados há cerca de cinquenta anos. Entretanto, ainda hoje, não se conhece o possível papel ou papéis dessas substâncias no metabolismo da planta (1). Somente a partir de 1960, houve um incremento das pesquisas, quando diversos grupos começaram a se interessar pela função fisiológica dos inibidores. Estas substâncias são parte de uma organização altamente complexa de proteínas de células vegetais e estão aparentemente envolvidas no desenvolvimento e proteção, não somente das sementes e órgãos de reserva, onde elas são concentradas, mas também dos tecidos aéreos. Acredita-se que os inibidores possam desempenhar as seguintes funções (4, 5, 21, 22):

- a. agentes regulatórios controladores das proteinases endógenas;
- b. proteínas de reserva;
- c. agentes protetores contra proteinases de insetos e microrganismos.

a. Inibidores como agentes regulatórios controladores das proteinases endógenas.

Sabe-se que a germinação é um processo altamente organizado e que se completa em poucos dias. Mesmo assim, a atividade das proteinases envolvidas nele pode mudar bastante durante esta fase, de acordo com as necessidades da planta.

Em sementes de arroz, os inibidores de proteinases não variam de concentração durante os estágios iniciais de germinação e, conseqüentemente, parecem não controlar a proteólise (21). Similarmen-te, parecem não controlar a proteólise (21). Similarmen-te ao arroz, os inibidores endógenos de ervilha não controlam a atividade das enzimas proteolíticas, apesar de serem aparentemente destruídos durante os estágios iniciais da germinação (21).

Em contraste, Shain e Mayer (23) encontraram que inibidores de proteinases em sementes de alface inibem a atividade de uma enzima proteolítica endógena. Posteriormente, essa enzima foi qualificada como "semelhante à tripsina" em especificidade. Verificaram também que, à medida que a germinação dessas sementes evoluía, os inibidores iam desaparecendo e a atividade enzimática aumentando. Esses fatos sugerem que a enzima preexiste na semente dormente, complexada com o inibidor ou preexiste como zimogênio, sendo ativada autocataliticamente ou por meio de outras enzimas. Similarmen-te à alface, durante a germinação de cevada os inibidores de proteinases endógenas desaparecem, antes que a atividade das endopeptidases comece a aumentar (15). Nesses casos, os inibidores parecem ter função reguladora da proteólise.

Xavier Filho (18), estudando a germinação de *Vigna sinensis* cv. seridô, sugeriu que, pelo menos, parte dos inibidores de tripsina estariam atuando como agentes reguladores de proteinases endógenas. Evidências semelhantes foram obtidas por Royer e Gennis e Cantor estudando o gênero *Vigna* (16, 17, 18, 24).

Os inibidores de tripsina parecem, em certos casos, controlar o início da proteólise durante a germinação, apesar de, em outros, eles serem remanescentes do desenvolvimento da semente, quando eles atuaram protegendo as proteínas de reserva da decomposição (21).

Alguns achados contraditórios acerca dos inibidores de proteinases são provavelmente devido a sua ampla distribuição em diferentes partes da semente, embrião, endosperma e cotilédone. Controle funcional importante na germinação, pode ser descrito somente para inibidores que atuam sobre enzimas no eixo embrionário. Proteólise na camada de aleurona ou cotilédones é presumivelmente um evento posterior, o qual fornece materiais pa

ra as sementes germinantes, mas não controla o início da germinação (21).

b. Inibidores como proteínas de reserva.

Devido às altas concentrações de inibidores detectadas em sementes e tubérculos, acredita-se que os inibidores possam também desempenhar função de proteína de reserva.

Uma das provas do funcionamento dos inibidores como reserva proteica foi obtida através de técnicas imunológicas, durante o ciclo de vida da batata (4). A referida técnica distingue o inibidor de quimiotripsina I de todos os inibidores presentes. Desta maneira, quando pedaços de sementes do tubérculo da batata foram germinados, o inibidor I desapareceu inteiramente dentro de poucos dias, enquanto a nova planta emergiu e cresceu (4). O caule e as partes aéreas recém-formados cresceram contendo apreciáveis quantidades de inibidor I. Quando os novos tubérculos foram estabelecidos, acumularam inibidor I, à medida que a concentração nos tecidos aéreos diminuía.

Pusztai (25), analisando inibidores de *Phaseolus vulgaris*, encontrou elevados índices de cistina. Devido à deficiência em aminoácidos que contêm enxofre, normalmente encontrada nas proteínas do feijão, Pusztai conjecturou que os inibidores poderiam se constituir em reserva de enxofre para a planta.

Shumway e Ryan (citado em 4), utilizando células de batatas e tomates, fizeram um relacionamento direto entre a presença de densos corpos protéicos nos vacúolos das células e a presença do inibidor I. Posteriormente Shumway, Cheng e Ryan (citado em 4) confirmaram, através de anticorpos específicos marcados com ferritina, que o inibidor I é um componente vacuolar dos corpos proteicos.

Shumway, Cheng e Ryan (citado em 4), também detectaram, através de técnicas imunológicas, o inibidor I acumulado em vacúolos de células meristemáticas. E através de microscopia eletrônica, eles de fato confirmaram que os corpos proteicos acumulam-se em pequenos vacúolos de células jovens no meristema apical. Verificaram ainda que, à medida que as células amadureciam, um vacúolo central ia aumentando, enquanto os corpos protei-

ções desapareciam. O fato estudado sugere que o inibidor I estava sendo utilizado para o crescimento e desenvolvimento da planta.

Kirsi e Mikola (15) detectaram a presença de inibidores na radícula de cevada jovem e notaram que estes desapareciam, à medida que a mesma crescia, demonstrando, assim, que os inibidores estavam desempenhando uma função similar àquela encontrada no meristema apical do tomate.

c. Inibidores como agentes protetores contra proteínases de insetos e microrganismos.

Inúmeros microrganismos secretam proteínases que facilitam a invasão microbiana nos tecidos vegetais, provavelmente, pela hidrólise das proteínas localizadas no interior e entre as paredes celulares (4). As altas concentrações de inibidores nos tecidos vegetais podem retardar a proteólise nas paredes celulares e nas proteínas da membrana, reduzindo, assim, a possibilidade de uma desorganização celular.

Determinadas enzimas, como a pronase e subtilisina, secretadas por microrganismos, são semelhantes à tripsina e quimiotripsina em suas especificidades (4). Essas enzimas, quando reagem com os inibidores de tripsina e quimiotripsina de plantas, são fortemente inibidas. Assim, os inibidores constituem um meio que a planta utilizaria para reprimir as proteínases patogênicas extracelulares.

Mickel e Standish (citado em 4) observaram que larvas de determinados insetos não se desenvolviam normalmente sobre produtos de soja. Essas observações levaram Lipke et al. (citado em 4) a estudar a toxicidade dos inibidores de soja sobre o desenvolvimento completo de *Tribolium confusum*. Apesar dos resultados terem sido negativos para os inibidores de tripsina, foi revelada a presença de um inibidor específico para uma protease do *Tribolium* larval.

Objetivos da investigação

O desaparecimento dos inibidores de tripsina e quimiotripsina dos cotilédones de sementes germinantes de leguminosas é um fato estabelecido.

Em *Vigna sinensis*, particularmente, Xavier Filho (18) mostrou que os inibidores de tripsina diminuem continuamente durante a germinação e que o eixo embrionário controla o desaparecimento da atividade inibitória dos cotilédones. Apesar de todo o interesse pelos inibidores de proteinases nos últimos cinquenta anos, somente ocasionalmente sua função fisiológica tem sido pesquisada. Não se sabe ainda como essas substâncias são mobilizadas nem o seu papel fisiológico durante a germinação.

O que se conhece atualmente sobre os inibidores é algo conflitante. Essas contradições podem ser devidas a:

- a. ampla distribuição dos inibidores por diversas famílias botânicas;
- b. ocorrência dos inibidores em diversos órgãos e tecidos vegetais;
- c. existência de inúmeros tipos de inibidores de tripsina e quimiotripsina;
- d. utilização, em experiências, de inibidores brutos ou não inteiramente purificados;
- e. existência de substâncias não protéicas capazes de inibir as enzimas proteolíticas e que causam outras alterações fisiológicas.

Em nosso trabalho, pretendemos elucidar a maneira como se dispõem os inibidores de tripsina e quimiotripsina nos cotilédones de *Vigna sinensis* cv. seridô e como eles são mobilizados durante a germinação. Pretendemos determinar ainda onde esses inibidores aparecem após o estabelecimento da plântula.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

II - A. Materiais

Sementes de feijão de corda (*Vigna sinensis* L (Savi) cv. seridô) foram fornecidas pelo Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

Caseína - Preparada segundo Hammarsten; obtida de E. Merck AG Darmstadt, Alemanha.

Tripsina - Preparações cristalinas adquiridas de Nutritional Biochemicals Co. (NBCo), EUA.

Quimiotripsina - Preparações cristalinas adquiridas de Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Acetil - DL - Fenilalanina- β - Naftil Éster - Foi uma preparação de Sigma Chemical Co., St- Louis, EUA.

O-Dianisidina Tetrazotizada - Foi adquirida de E. Merck AG Darmstadt, Alemanha.

Safranina - Foi uma preparação de E. Merck AG Darmstadt, Alemanha.

Azul de Toluidina - Foi uma preparação de E. Merck AG Darmstadt, Alemanha.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

II. B. Métodos

1. Condições de germinação

Sementes selecionadas foram imersas em 5,2% de cloro ativo (Brilux) por um período de 10 minutos, com a finalidade de evitar o desenvolvimento de microrganismos durante a germinação. As cubas e cubetas a serem utilizadas receberam tratamento idêntico. O papel utilizado (mata-borrão de 80g/m²), foi esterilizado em autoclave, a uma temperatura de 120°C, durante 20 minutos. As sementes foram então embebidas em água destilada por um período de 4 horas, findo o qual foram postas a germinar entre duas folhas de papel (30 x 30cm) umedecidas com água destilada. As folhas de papel, enroladas sobre si e contendo as sementes para germinar foram colocadas em cubetas, que continham 20 ml de água destilada e as mesmas foram colocadas numa cuba germinativa.

Durante o período em que se processava a germinação, amostras foram sendo retiradas para realização deste trabalho, a intervalos de 4, 24, 72, 120 e 168 horas.

2. Preparação dos extratos

Coletadas as amostras das sementes germinadas, o envoltório epidérmico foi desprezado, o eixo embrionário destacado e os cotilédones separados em direito e esquerdo, conforme padronização mostrada na Fig. 1. Cada cotilédone foi dividido transversalmente em três porções (Fig. 2) que denominamos de:

- . secção proximal direita (SPD)
- . secção mediana direita (SMD)
- . secção distal direita (SDD)
- . secção proximal esquerda (SPE)
- . secção mediana esquerda (SME)
- . secção distal esquerda (SDE)

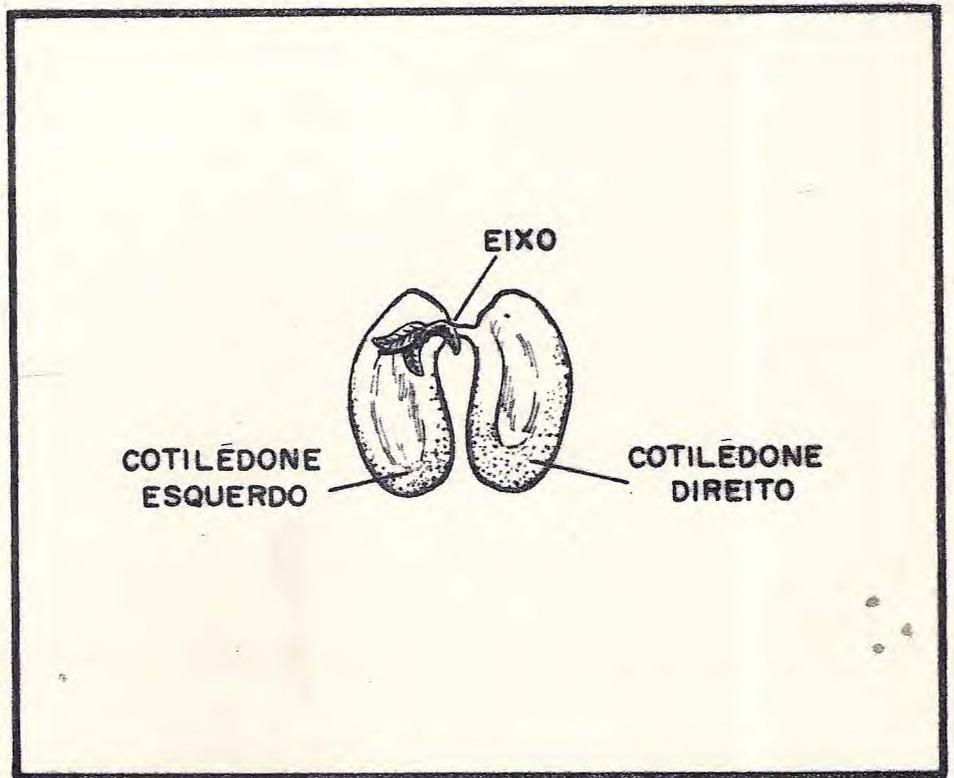


Figura 1 - Padronização dos cotilédones em direito e esquerdo.

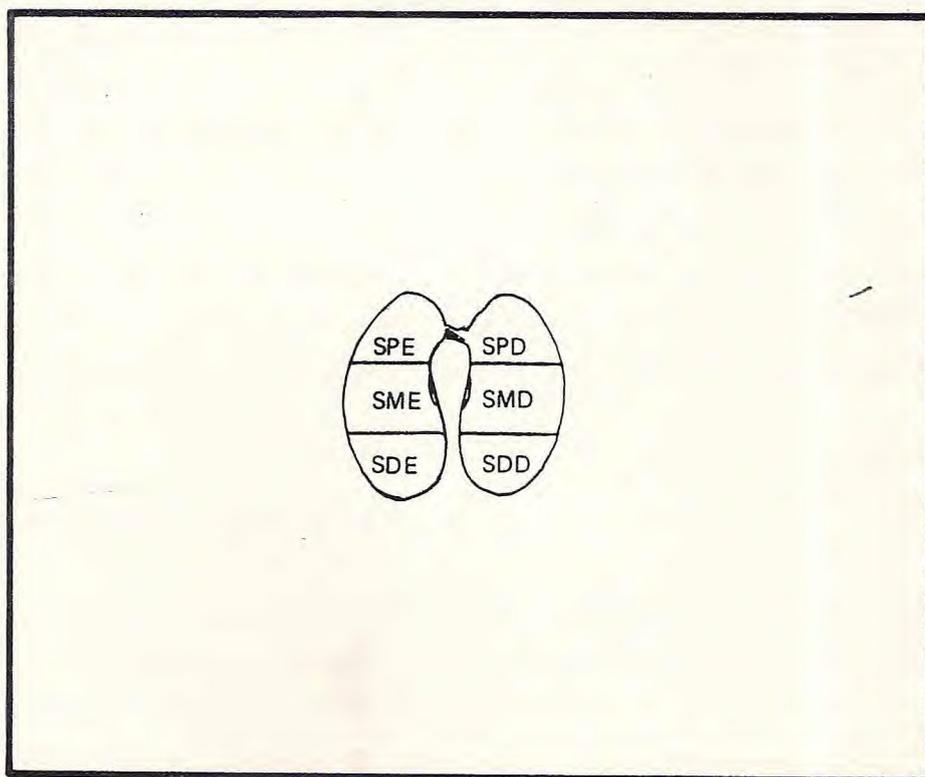


Figura 2 - Padronização das secções cotiledonárias:

- SPD - secção proximal direita
- SMD - secção mediana direita
- SDD - secção distal direita
- SPE - secção proximal esquerda
- SME - secção mediana esquerda
- SDE - secção distal esquerda.

. o eixo embrionário foi separado em duas porções: hipocótilo-radícula (HR) e epicótilo-plúmulas (EP).

Para padronização das secções, foi projetada e construída, em nosso laboratório, uma "guilhotina" dotada de lâminas paralelas (Figs. 3 e 4), com o auxílio da qual obtivemos secções com pesos uniformes (Tabela I).

Preparadas as secções, as mesmas, juntamente com os eixos embrionários, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas, foram colocadas em diferentes almofarizes e as proteínas foram extraídas durante 1 hora com tetraborato de sódio 0,1 M, NaCl 0,3 M, ajustado a pH 8,0. Os extratos obtidos foram centrifugados a 2.500 X G, os sobrenadantes recolhidos e os precipitados desprezados.

3. Determinação de peso fresco

O peso fresco de cada secção foi determinado pela média aritmética dos pesos de dez amostras. Paralelamente foi determinado o peso fresco do eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas.

4. Determinação do peso seco

O peso seco das secções cotiledonárias, eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas, foi determinado, submetendo-se as diversas secções a uma temperatura de 110°C, por um período de 24 horas, findo o qual as amostras foram retiradas, colocadas em dessecador contendo P₂O₅ e posteriormente pesadas.

5. Determinação de proteínas

A concentração de proteínas nos diversos extratos foi determinada pelo método do microbiureto a 330nm (26), utilizando-se um espectrofotômetro Beckman DU e albumina sérica bovina como padrão.

Figura 3 - "Guilhotina", vista de frente

Figura 4 - "Guilhotina", vista lateral.

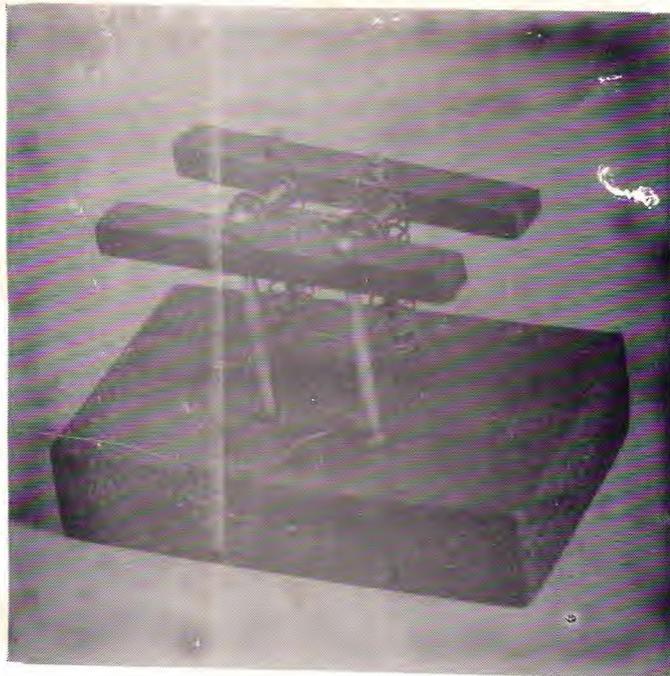


Figura 3

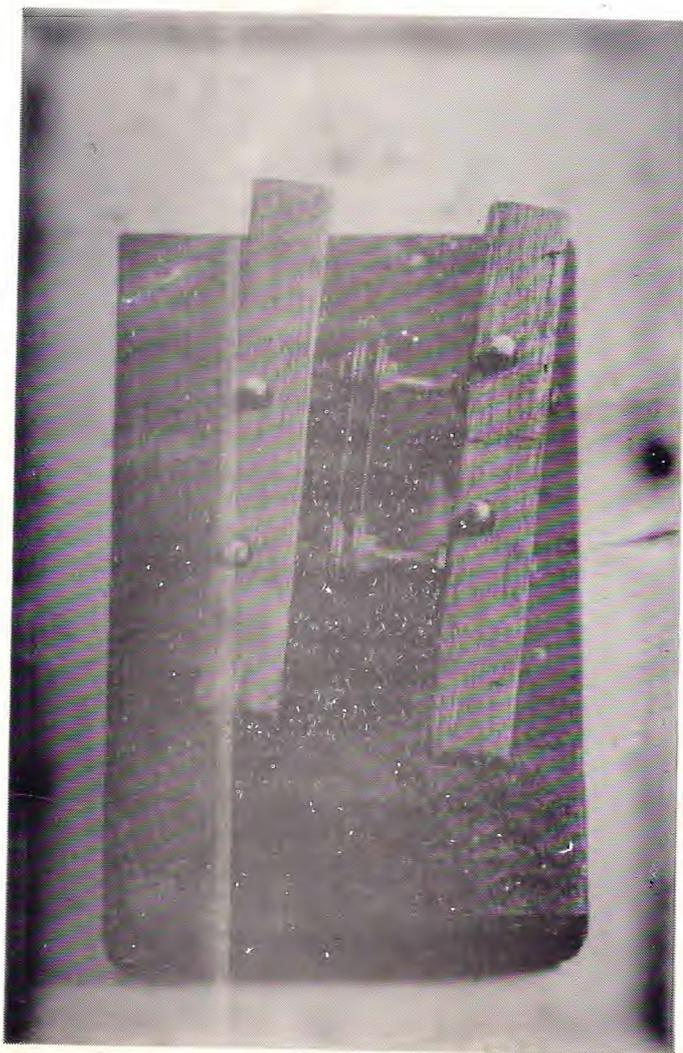


Figura 4

6. Determinação de proteinases e inibidores

a. Tripsina

A Tripsina foi dissolvida em HCl 0,0025 M e as determinações das concentrações de soluções estoque foram feitas por meio de leituras de absorbância a 280 nm em um espectrofotômetro Beckman DU, usando-se F_{280}^1 mg/ml = 0,621 (27). As soluções continham de 0,345 a 0,379 mg/ml.

Para determinação da atividade caseinolítica da tripsina foi utilizado o método da digestibilidade de Kunitz (28), sendo que os ensaios foram feitos da seguinte maneira: uma amostra de solução estoque de tripsina foi diluída com HCl 0,0025 M a fim de obtermos a concentração a ser utilizada nos ensaios de atividade; em seguida foi adicionado 1 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7,6 a diversos tubos de ensaios; alíquotas da solução diluída de tripsina em volumes crescentes foram então colocadas nos citados tubos e o volume completado para 2 ml com HCl 0,0025 M; os tubos assim preparados foram colocados em banho a 37°C e, então, 1 ml de caseína, a 1%, dissolvida em tampão fosfato 0,1 M pH 7,6, foi adicionado. Após 20 minutos, a reação foi parada com 3 ml de ácido tricloroacético (TCA) 5%. Provas em branco foram feitas para as concentrações extremas de tripsina, sendo que nesses tubos a adição de TCA precedeu à de caseína. Estimativas das provas em branco para concentrações intermediárias de tripsina foram feitas por interpolação. Os tubos foram retirados do banho e colocados em repouso por um período de 30 minutos. As suspensões foram filtradas em papel quantitativo e a atividade da tripsina foi avaliada através do reagente de Folin, modificado por Lowry et al. (29), utilizando 1 ml dos filtrados, neutralizados com 0,05 ml de NaOH 2 M e a leitura de densidade ótica feita a 750 nm.

b. Quimiotripsina

A quimiotripsina foi dissolvida em água destilada e as determinações das concentrações das soluções estoques foram feitas por meio de leituras de absorbâncias, a 280 nm em espectrofotômetro Beckman DU, usando-se F_{280}^1 mg/ml

= 0,500 (28). As referidas soluções continham de 0,355 a 0,380 mg/ml.

Para determinação da atividade caseinolítica da quimiotripsina, foi utilizado o método da digestibilidade de Kunitz (28), sendo que os ensaios quimiotrípticos se processaram de maneira idêntica ao descrito para a tripsina. Água destilada foi utilizada no lugar de HCl 0,0025 M.

c. Atividade inibitória

A atividade inibitória das diversas preparações foi determinada, comparando-se a atividade das amostras contendo inibidor em quantidades crescentes, com a atividade de soluções de tripsina ou quimiotripsina sem inibidor. O método utilizado foi o de Kunitz descrito anteriormente. Foram feitas provas em branco para enzima e para concentrações extremas de inibidor. Para as concentrações intermediárias, os valores das provas foram obtidos por interpolação. As atividades foram expressas em UI/parte, UI/mg peso fresco, UI/mg de peso seco, UI/mg de proteína, utilizando-se a definição de unidade de inibidor, proposta por Xavier Filho (30).

7. Detectação de inibidores de tripsina e quimiotripsina em cortes transversais de cotilédones de feijão de corda cv. seridô.

Com a finalidade de verificar como se faz a mobilização dos inibidores de tripsina e quimiotripsina no sentido transversal em cotilédones de *Vigna sinensis*, foi desenvolvido um método de localização de inibidores de proteases baseado no método de coramento negativo de Uriel e Berges (31).

a. Preparação do filme de gel de agar

8,0 ml de uma solução a 2% de gel de agar Oxoid, em água destilada, foram espalhados sobre uma lâmina de vidro (11,9 x 8,9 cm) a fim de obter-se uma fina película. Após esfriamento do gel, o mesmo foi recoberto com 5,3 ml de tripsina 0,5 mg/ml, dissolvida em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4, por 30 minutos, após o que o excesso de solução foi retirado e o gel lavado com

água destilada. Com a finalidade de evitar a difusão dos inibidores no gel, a lâmina assim preparada, antes de ser utilizada, foi posta para secar durante 24 horas à temperatura ambiente (24°C).

Lâminas contendo quimiotripsina foram preparadas de maneira idêntica, sendo que a concentração de quimiotripsina foi de 0,05 mg/ml.

b. Preparação dos cortes de cotilédones

Foram utilizadas sementes de feijão com 4 horas de embebição, 96 e 168 horas de germinação. As amostras foram retiradas das cubas germinativas, a cobertura epidérmica desprezada e os cotilédones separados. Foram feitos então cortes transversais a mão livre, com lâmina de barbear, na porção mediana dos cotilédones. Os referidos cortes foram fixados em formol 4% durante 1 minuto e, posteriormente, lavados durante 20 minutos com tampão fosfato 0,1 M pH 7,4. Com a finalidade de impedir a atividade de enzimas "semelhantes à tripsina", existentes nos cotilédones de *Vigna sinensis* que mascaravam os nossos resultados, os cortes assim preparados sofreram "choque térmico" durante 5 minutos a 60°C. Nesta condições, a atividade inibitória aparentemente não é afetada.

c. Contacto dos cortes de cotilédones com o gel de agar

Preparados os cortes de cotilédones, os mesmos foram colocados a mão livre, em contacto com o gel, numa câmara úmida, por um período que variou entre 1 e 30 minutos. Terminado este período, os cortes foram cuidadosamente retirados e o gel foi imerso por 30 minutos em uma mistura de 5 ml de APNE 2,5 mg/ml em dimetilformamida e 45 ml de uma solução de o-dianisidina tetrazotizada em tampão fosfato 0,1 pH 7,4. Após 30 minutos, o gel foi colocado em ácido acético 7%, lavado com água destilada e posto para secar. Fotografias de secções escolhidas foram tomadas com aumento de 10 vezes.

8. Diafanização de cotilédones para identificação da disposição das nervuras cotiledonárias

A disposição das nervuras cotiledonárias foi determinada pelo método de diafanização citado por Isaia (32), utilizando-se sementes com 168 horas de germinação. O referido método consta de:

- fixação em formol a 4%
- 12 horas num banho de etanol a 70%
- 72 horas num banho de KOH a 3%
- 48 horas num banho de KOH a 5% em etanol 50%
- 12 horas num banho de etanol 70%
- 96 horas num banho de hidrato de cloral a 5% em etanol 70%
- 12 horas num banho de etanol 95%
- 15 minutos num banho de H_2O_2 8% em etanol a 90% (ao sol)
- desidratação completa com etanol absoluto
- 30 minutos de coloração com safranina 0,1% em etanol-xilol (2:1)
- diferenciação em xilol saturado de fenol e misturado ao xilol puro na proporção de 2:3
- lavagem com xilol puro
- fotografias com 10 vezes de aumento

9. Identificação dos feixes vasculares em cortes transversais de cotilédones de feijão de corda cv. seridô

Com a finalidade de identificar os feixes vasculares em cortes transversais, foram feitos cortes na porção mediana de cotilédones de feijão com 4 horas de embebição e 96 e 168 horas de germinação. Os cortes foram corados com safranina 0,1% em etanol-xilol (2:1, v/v), através de técnicas usuais de coloração.

10. Detecção de proteínas em cotilédones de feijão de corda cv. seridó

Com a finalidade de verificar o processo de degradação das proteínas, cortes transversais de cotilédones com 4 horas de embebição e 96 e 168 horas de germinação — depois de desidratados em bateria água-álcool —, foram corados com azul de toluidina 0,1% em etanol-xilol (2:1 v/v), através de técnicas usuais de coloração.

III. RESULTADOS

1. Determinação de peso fresco e peso seco

Na Tabela I, estão apresentados os resultados obtidos nas determinações de peso fresco e peso seco das diversas secções cotiledonárias, do eixo, do hipocótilo-radícula e do epicótilo-plúmulas. Como todos os resultados encontrados para as secções cotiledonárias direitas e esquerdas foram semelhantes, passamos a chamar as referidas secções apenas de secção proximal, secção mediana e secção distal.

A variação máxima de peso fresco entre as diversas secções não chegou a 20% (15,17% entre SP e SM a 4 horas de embebição); para o peso seco esta variação atingiu o máximo de 13% (entre SP e SD, 24 horas de germinação). Os coeficientes de variação mostram que os cortes com a "guilhotina" foram bastante uniformes, tanto no que diz respeito a peso fresco como a peso seco.

Observando-se a fig. 5, vê-se que os pesos frescos das secções permanecem constantes até as 72 horas da germinação, quando então começam a diminuir. Ao contrário, os pesos secos das mesmas secções começam a diminuir logo nas primeiras 24 horas de germinação (fig. 6).

Nos eixos, hipocótilo-radícula e no epicótilo-plúmulas, os pesos frescos e secos aumentam sempre desde o início da germinação até o estabelecimento da plântula (figs. 7 e 8).

2. Determinação de proteínas

Examinando-se a Tabela II, observa-se que as SP, SM e SD apresentam concentrações de proteínas semelhantes. Isto foi mostrado quando as diversas médias foram comparadas utilizando-se o teste de t; os resultados foram não-significativos ao nível de 95%.

A fig. 9 sugere que, nas condições dos experimentos, há uma mobilização de proteínas maior nas primeiras 24 horas de germinação do que posteriormente.

TABELA I

PESOS FRESCOS E SECOS DAS SECÇÕES COTILEDONÁRIAS, EIXO, HIPOCÓTILO-RADÍCULA E EPICÓTILO-PLÚMULAS

TEMPO DE GERMINAÇÃO	SECÇÕES	PESO FRESCO			PESO SECO		
		MÉDIAS (MG)	δ	CV	MÉDIAS (MG)	δ	CV
4 HORAS	SP	62,35	7,93	12,72	33,38	4,70	14,08
	SM	73,50	4,31	5,86	34,98	3,50	10,01
	SD	64,19	10,44	16,27	34,14	5,02	14,73
	EIXO	8,91	0,90	10,10	3,35	0,32	9,55
24 HORAS	SP	66,86	1,66	2,48	25,34	1,87	7,38
	SM	73,13	1,67	2,28	29,16	0,85	2,91
	SD	73,83	1,93	2,61	29,17	0,88	3,02
	EIXO	67,28	5,41	8,04	6,24	0,69	11,06
72 HORAS	SP	65,24	7,68	11,77	23,34	0,89	3,81
	SM	70,28	1,27	1,81	24,16	1,21	5,01
	SD	70,06	4,83	6,89	25,06	2,80	11,17
	HR	216,44	10,06	4,65	26,81	1,56	5,82
	EP	37,42	0,52	1,38	16,94	3,08	18,18
120 HORAS	SP	41,51	6,15	14,82	9,84	2,51	25,51
	SM	38,88	4,03	10,36	10,30	2,13	20,68
	SD	41,08	7,42	18,10	9,32	2,20	23,60
	HR	844,90	54,21	6,42	58,53	8,41	14,37
	EP	155,06	24,46	15,78	23,45	2,71	11,56
168 HORAS	SP	18,23	0,30	1,65	2,62	0,17	6,49
	SM	17,65	2,93	16,60	2,49	0,21	8,43
	SD	18,17	2,08	12,43	2,00	0,10	5,00
	HR	1.074,14	49,05	4,57	69,67	1,98	2,84
	EP	636,10	28,90	4,52	38,47	2,16	5,61

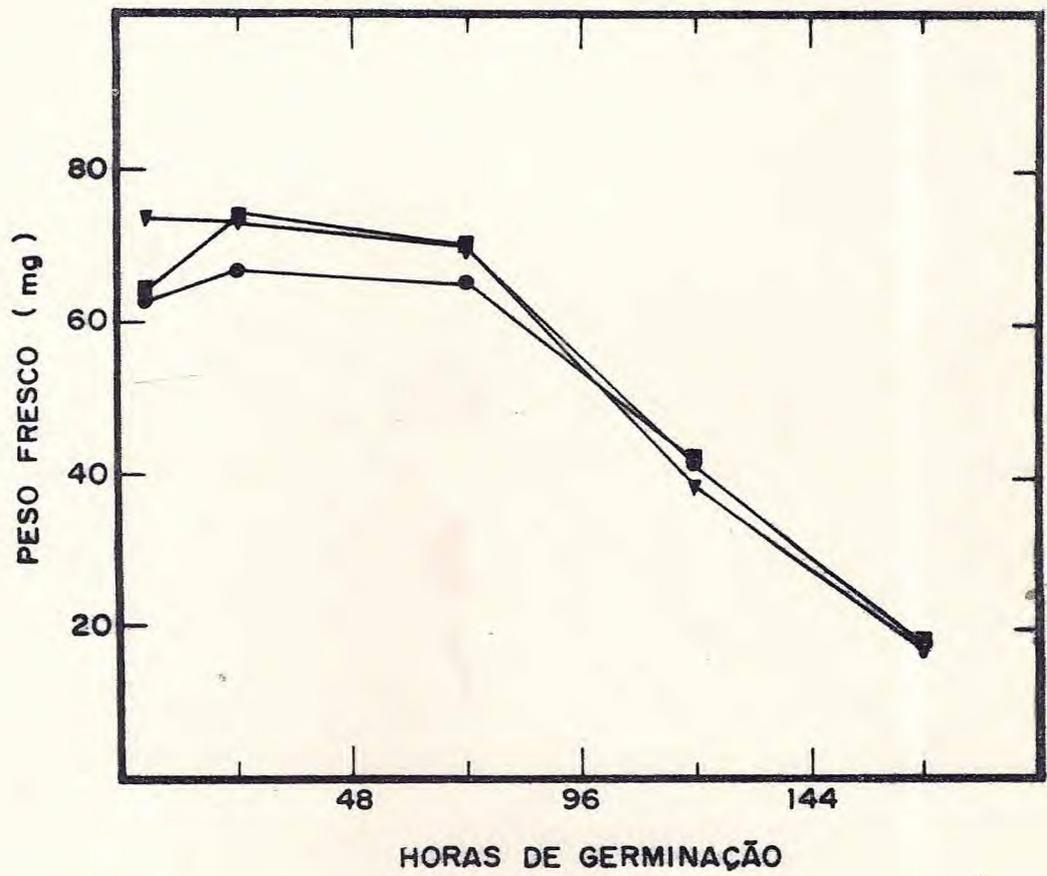


Figura 5 - Pesos frescos das secções cotiledonárias. SP (—●—), SM (—▼—) e SD (—■—).

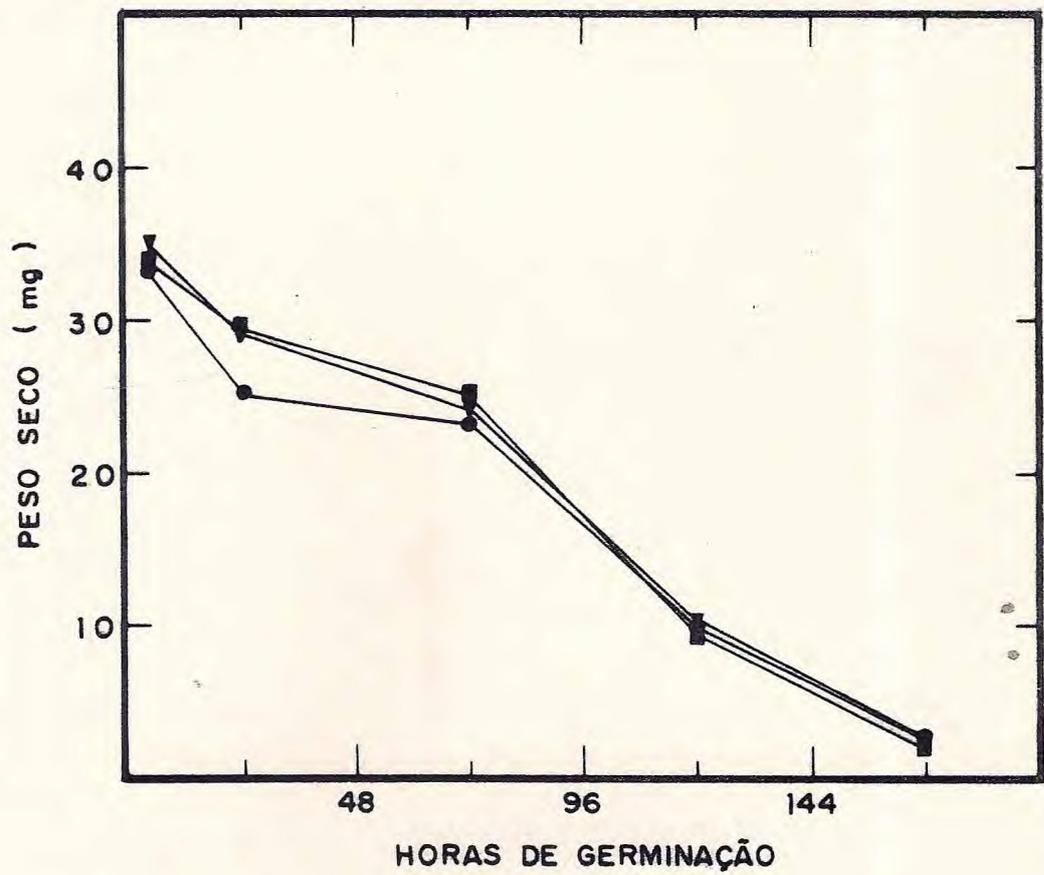


Figura 6 - Pesos secos das secções cotiledonárias. SP (—●—), SM (—▼—) e SD (—■—).

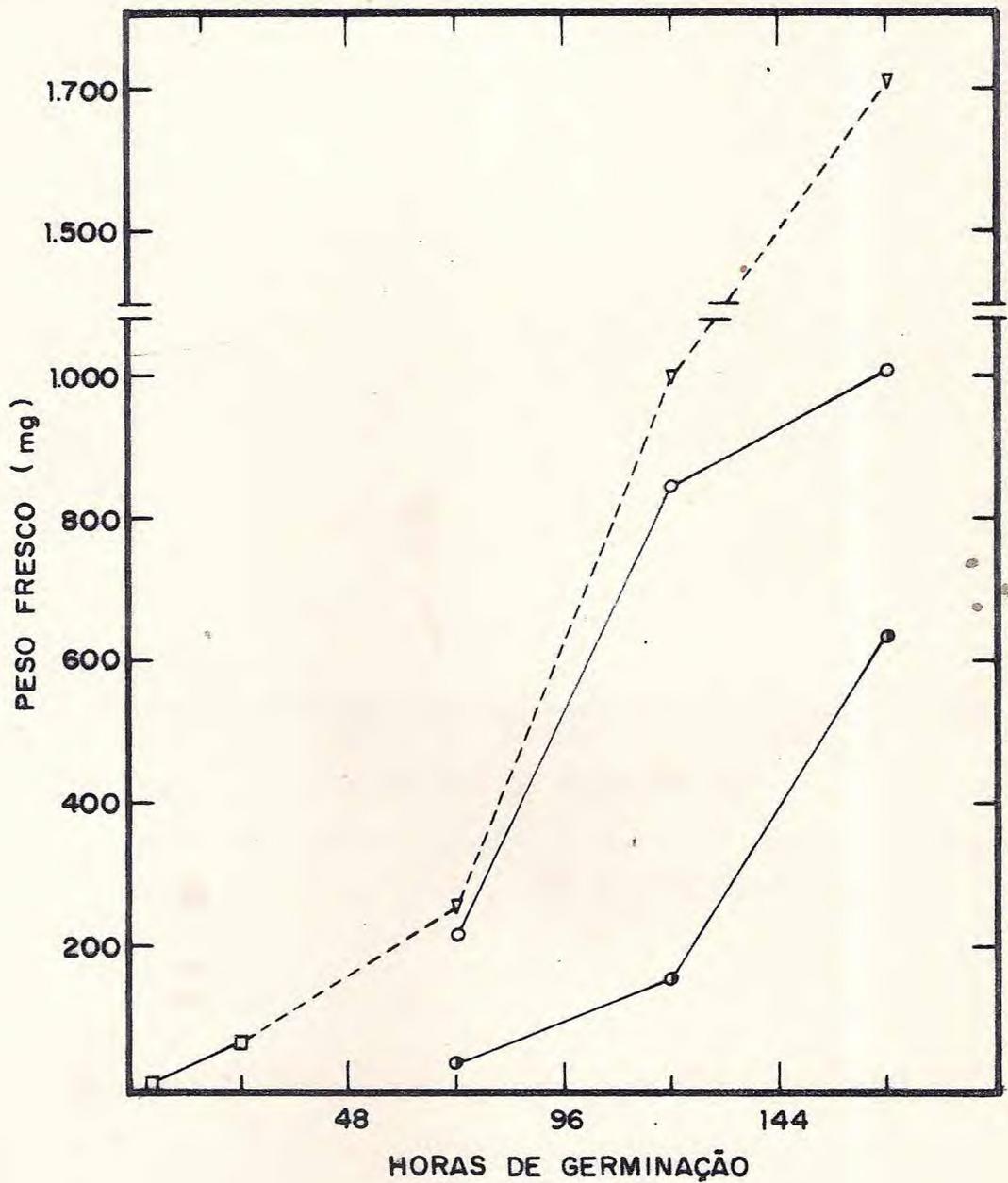


Figura 7 - Pesos frescos do eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas: Eixo (—□—), HR (—○—), EP (—●—) e HR+EP (---▽---).

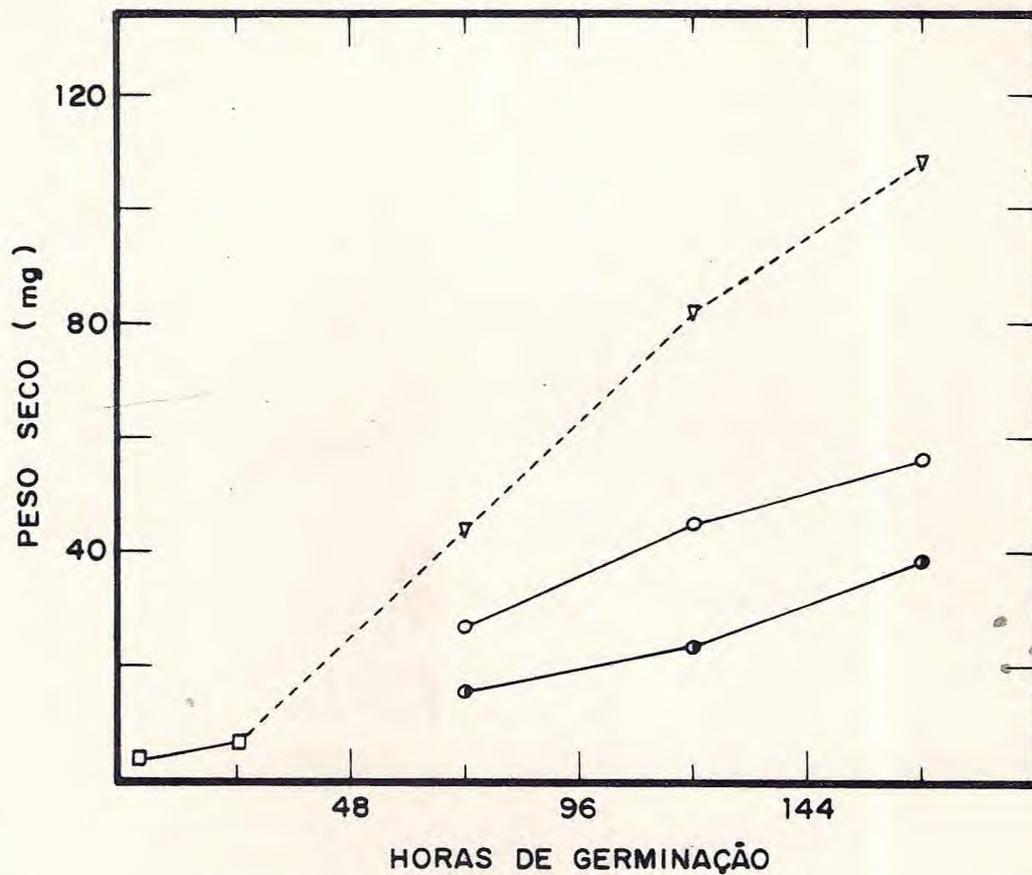


Figura 8 - Pesos secos do eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas. Eixo (—□—), HR (—○—), EP (—●—) e HR+EP (—▽—).

TABELA II
 ATIVIDADES INIBITÓRIAS DA TRIPSINA

TEMPO DE GERMINAÇÃO	SEÇÕES	PROTEÍNA (MG/MG)			UIT/PARTE			UIT/MG DE PESO FRESCO			UIT/MG DE PROTEÍNA			UIT/MG DE PESO SECO		
		MÉDIAS	%	CV	MÉDIAS	%	CV	MÉDIAS	%	CV	MÉDIAS	%	CV	MÉDIAS	%	CV
4 HORAS	SP	0,260	0,016	6,15	139,76	12,52	8,96	2,14	0,11	5,05	8,26	0,63	7,67	4,18	0,37	8,95
	SM	0,231	0,051	22,08	116,86	4,13	3,53	1,66	0,13	7,84	6,70	0,48	7,10	3,34	0,11	3,44
	SD	0,259	0,022	8,49	90,25	15,05	16,67	1,40	0,25	17,84	5,42	0,91	16,79	2,64	0,19	7,31
	EIXO	0,414	0,027	6,52	23,99	4,15	17,31	0,27	0,04	14,82	0,66	0,09	13,25	7,16	1,24	17,32
24 HORAS	SP	0,208	0,019	9,21	157,41	31,96	20,31	2,40	0,56	23,45	11,50	2,18	18,98	6,21	1,26	20,29
	SM	0,194	0,005	2,63	157,76	11,99	7,60	2,20	0,19	8,84	11,46	1,49	13,00	5,41	0,42	7,69
	SD	0,195	0,026	13,23	144,81	13,87	9,55	1,92	0,44	22,76	10,12	3,23	31,92	4,97	1,42	28,59
	EIXO	0,084	0,014	16,67	17,60	0,54	3,08	0,026	0,001	5,00	0,31	0,04	14,19	2,82	0,10	3,55
72 HORAS	SP	0,172	0,024	13,95	86,65	11,25	12,98	1,34	0,34	25,48	7,43	1,25	16,82	3,83	0,39	10,29
	SM	0,168	0,012	7,14	97,37	13,99	14,37	1,37	0,29	20,82	7,60	1,32	17,50	4,03	0,58	14,37
	SD	0,179	0,010	5,59	80,30	23,25	28,96	1,17	0,38	32,95	6,54	2,04	31,18	3,20	0,93	28,97
	HR	0,028	0,004	13,57	8,10	0,82	10,12	0,004	0,0006	15,40	0,13	0,003	2,40	0,30	0,03	10,00
	EP	0,056	0,006	10,71	1,79	0,28	15,53	0,005	0,0008	16,25	0,089	0,02	24,72	0,11	0,02	14,54
120 HORAS	SP	0,137	0,016	11,53	50,53	15,25	30,18	1,13	0,24	21,12	8,28	1,92	23,19	5,14	1,55	30,19
	SM	0,143	0,000	0,00	51,01	15,55	30,48	1,18	0,28	24,24	8,03	1,93	24,01	4,95	1,51	30,50
	SD	0,132	0,000	0,00	43,93	13,67	31,12	0,88	0,23	26,14	6,44	1,64	25,51	4,71	1,55	32,89
	HR	0,020	0,001	6,00	3,70	0,17	4,68	0,00044	0,00001	2,27	0,02	0,001	5,45	0,06	0,003	4,76
	EP	0,032	0,002	5,00	2,87	0,07	2,47	0,002	0,0003	19,44	0,05	0,009	15,82	0,12	0,003	2,46
168 HORAS	SP	0,126	0,004	3,09	2,19	0,53	24,16	0,10	0,022	22,40	0,79	0,18	22,30	0,83	0,26	24,10
	SM	0,121	0,005	4,13	1,60	0,28	17,25	0,068	0,015	22,06	0,54	0,13	23,21	0,65	0,12	18,80
	SD	0,131	0,002	1,68	0,46	0,04	7,83	0,022	0,003	12,27	0,16	0,02	13,75	0,23	0,02	7,39
	HR	0,011	0,006	14,54	1,77	0,29	16,50	0,00016	0,00002	10,62	0,014	0,0010	7,14	0,025	0,004	16,60
	EP	0,018	0,001	5,55	4,77	0,14	2,96	0,00070	0,0001	14,28	0,04	0,0035	9,21	0,124	0,004	3,23

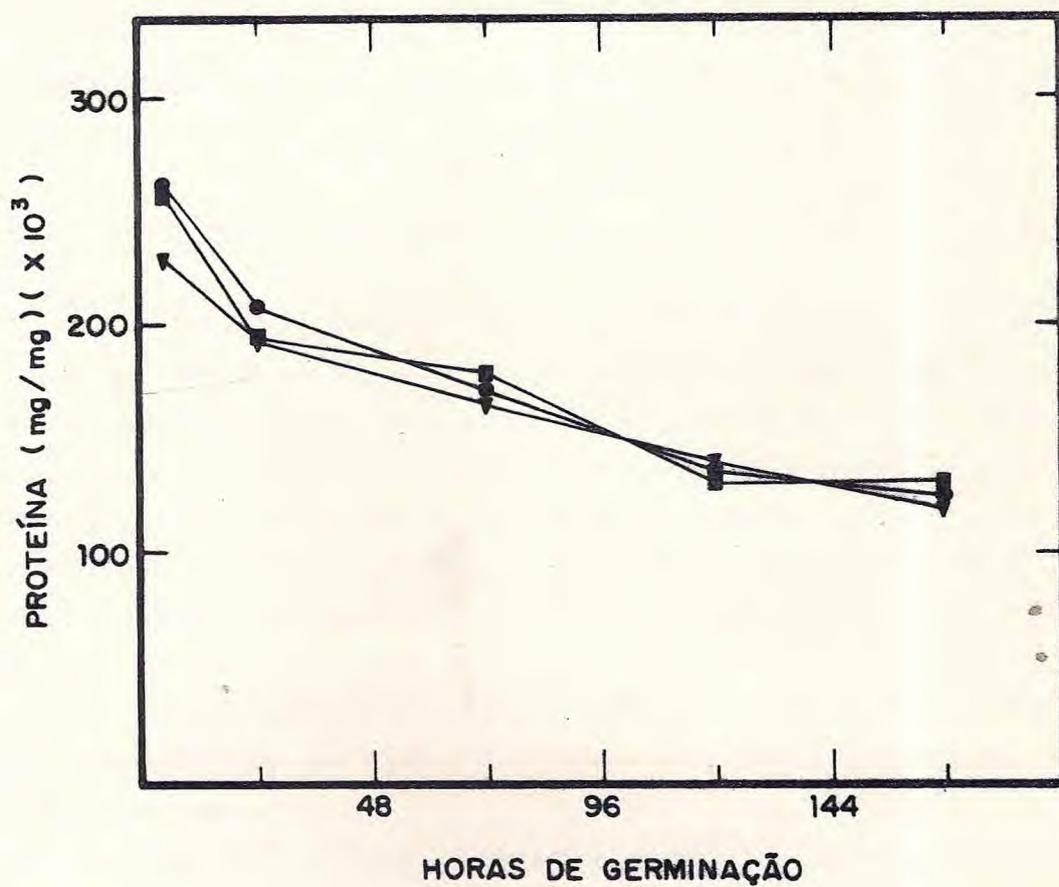


Figura 9 - Concentrações de proteínas das secções cotiledonárias. SP (—●—), SM (—▼—) e SD (—■—).

Ao final da investigação (168 horas de germinação), as concentrações de proteínas nas diversas secções tinham sido reduzidas, em média, de aproximadamente 50%.

No eixo, o decréscimo de concentração de proteínas nas primeiras 24 horas, foi de cerca de 80% (fig. 10). No hipocótilo-radícula e no epicótilo-plúmulas, a concentração de proteínas diminui, à medida que a germinação evolui (fig. 10).

3. Inibidores de tripsina

A Tabela II mostra ainda os resultados obtidos na determinação dos IT, os desvios padrão e os coeficientes de variação calculados. Cotilédones de sementes com 4 horas de embebição parecem apresentar um gradiente de concentração de IT que aumenta da porção distal para a porção proximal. Este gradiente é observado em quaisquer das unidades empregadas: UIT/parte, UIT/mg peso fresco, UIT/mg peso seco e UIT/mg de proteína (figs. 11, 12, 13 e 14); a diferença entre as médias foi significativa ao nível de 99%.

Com 24 horas de germinação, verifica-se um aumento significativo nos IT com relação aos níveis de 4 horas e o gradiente observado anteriormente parece ser desfeito.

Após as primeiras 24 horas de germinação, a velocidade de desaparecimento dos IT é maior na porção proximal do que na distal, fato este que parece contribuir para o desaparecimento do gradiente antes referido.

A mobilização continua até as 168 horas de germinação, quando praticamente todo cotilédone fica exaurido de inibidor. Esse resultado foi confirmado pela técnica de coramento negativo desenvolvida neste laboratório (ver em métodos).

Observando-se a fig. 13 (UIT/mg peso seco), verifica-se que a concentração dos IT decresce significativamente (a nível de 99% de certeza) na SP, das 24 às 72 horas de germinação. Entretanto, o decréscimo que ocorre na secção distal não é significativo com relação aos níveis encontrados para 24 horas. Com 120 horas, a concentração dos IT em todas as secções é

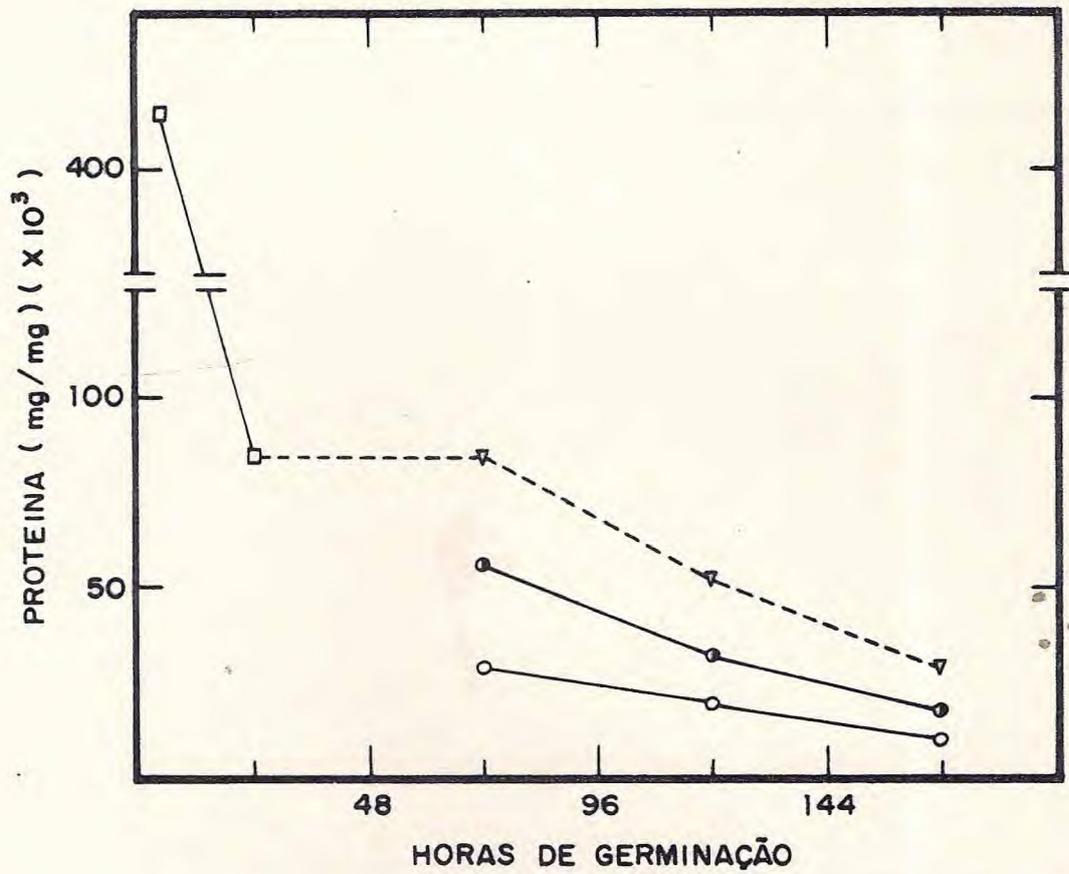


Figura 10 - Concentrações de proteínas do eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas. Eixo (—□—), HR (—○—), EP (—●—) e HR+EP (---▽---).

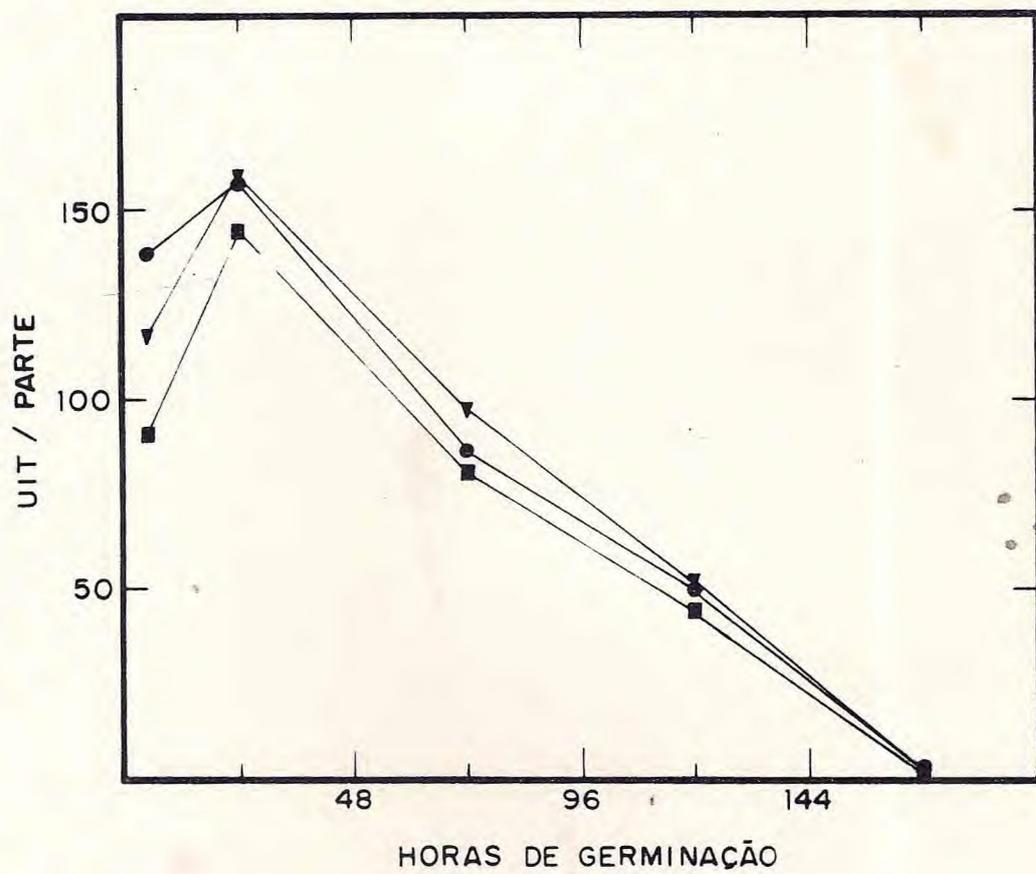


Figura 11 - Inibidores de tripsina das secções cotiledonárias. SP (—●—), SM (—▼—) e SD (—■—).

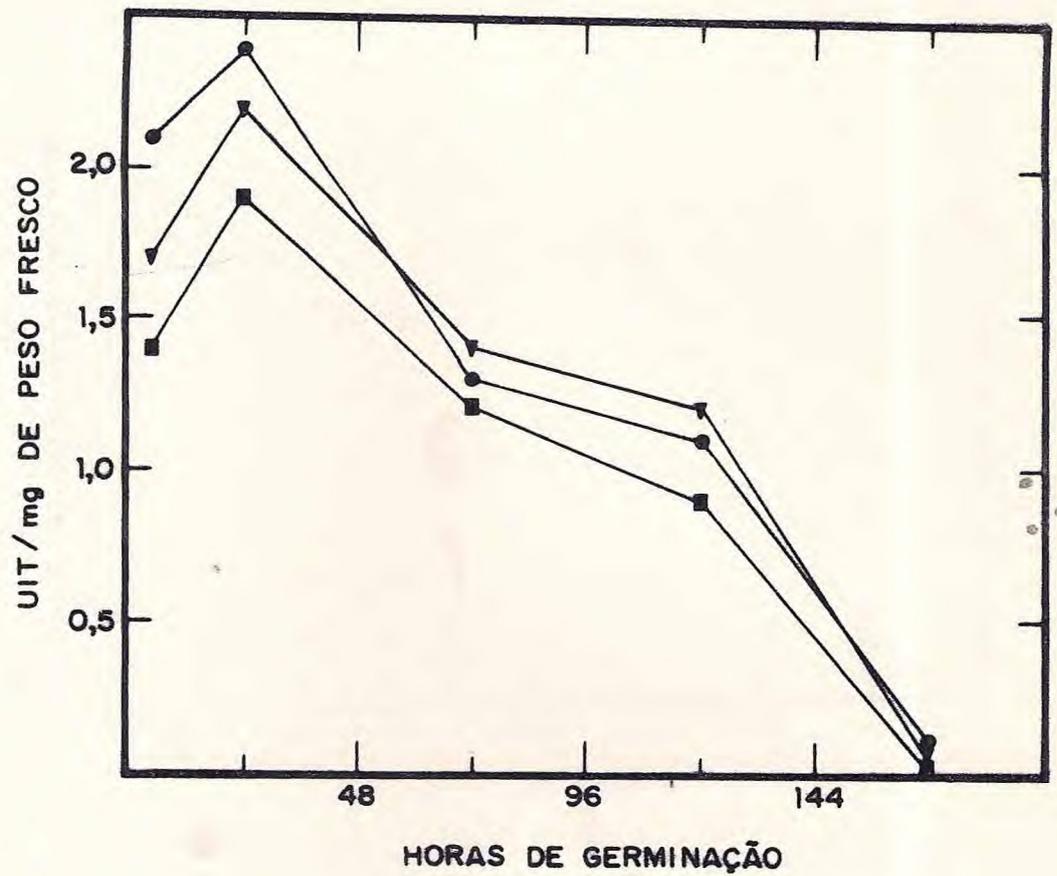


Figura 12 - Concentrações de inibidores de tripsina referidas a peso fresco das secções cotiledonárias. SP (—●—), SM (—▼—) e SD (—■—).

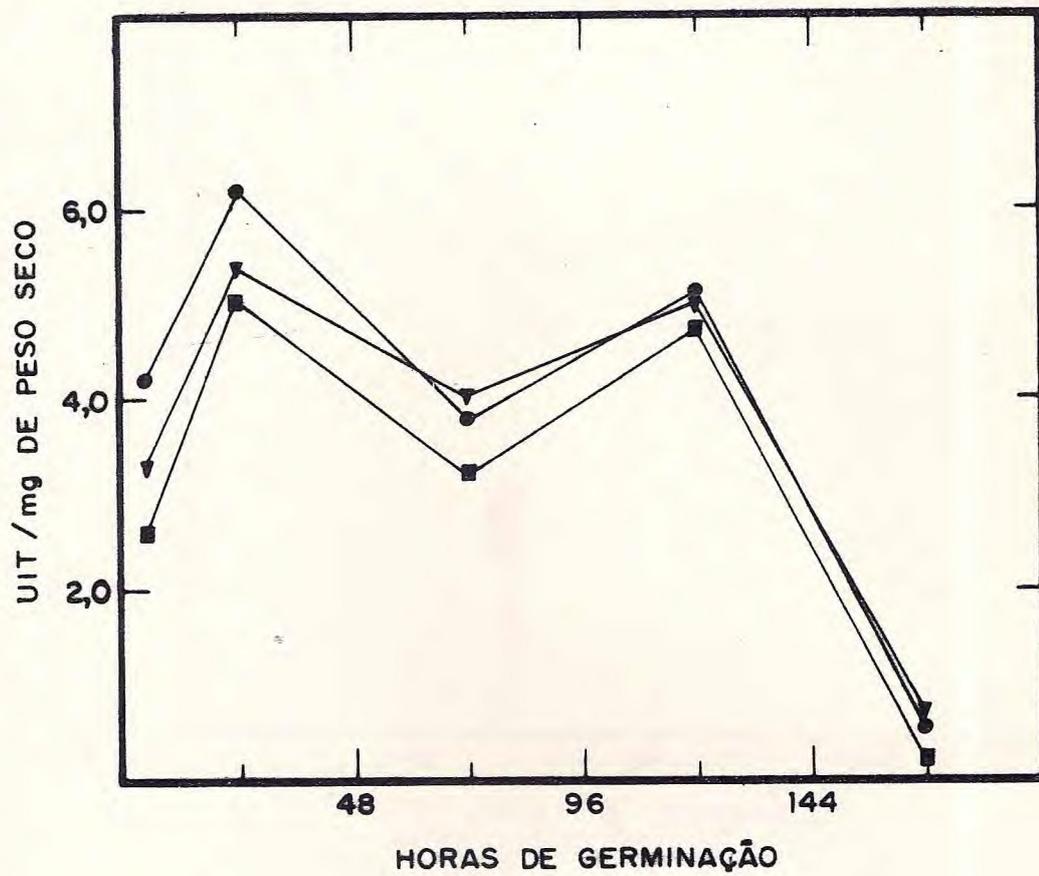


Figura 13 - Concentrações de inibidores de tripsina referidas a peso seco das secções cotiledonárias. SP (—●—), SM (—▼—) e SD (—■—).

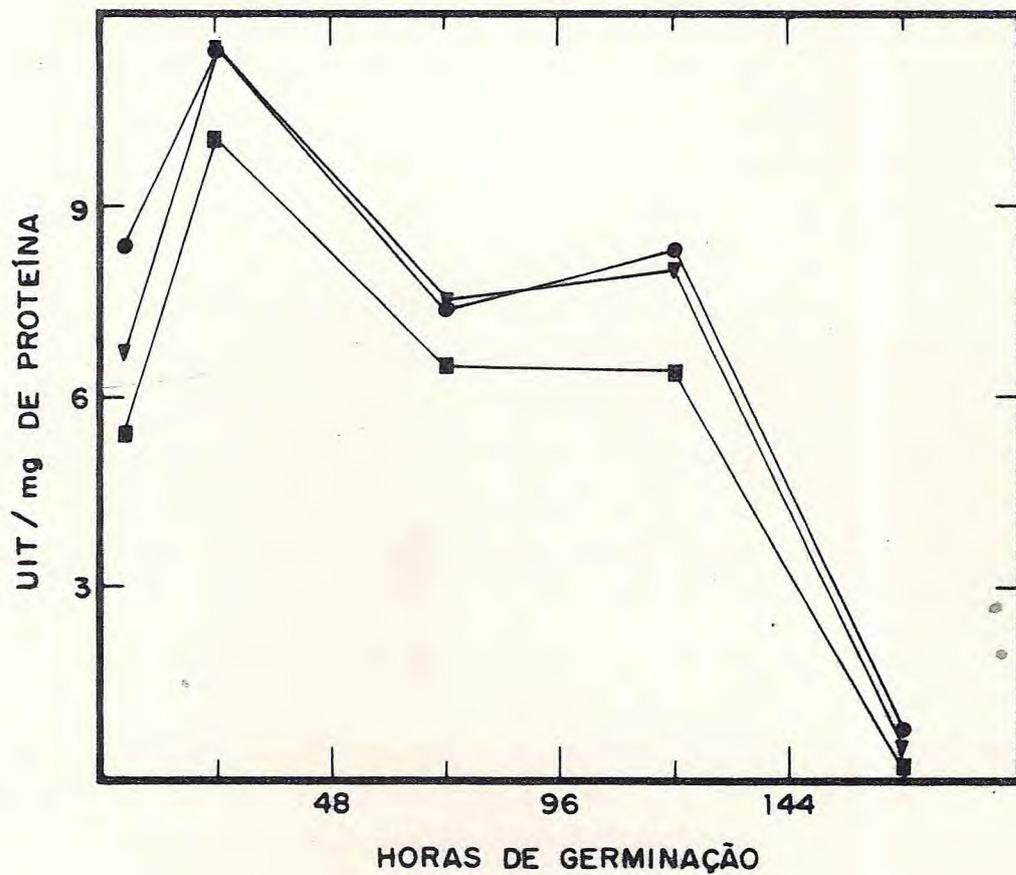


Figura 14 - Atividade específica de inibidores de tripsina das secções cotiledonárias. SP (—●—), SM (—▼—) e SD (—■—).

semelhante àquela encontrada para as 24 horas de germinação. Após esse período, a mobilização se intensifica e a concentração dos inibidores decresce rapidamente. A mobilização fica praticamente completa até 168 horas de germinação. A concentração dos IT, quando referida a peso fresco (fig. 12), decresce logo a partir das primeiras 24 horas, já que o peso fresco permanece constante até 72 horas de germinação (fig. 5).

A atividade específica dos IT (UIT/mg de proteína) decai lentamente das 24 às 72 horas, daí permanece praticamente constante até 120 horas, quando então decresce rapidamente até 168 horas de germinação (fig. 14).

A metabolização dos IT no eixo, durante as primeiras 24 horas, é bastante intensa, sendo maior que a observada na proximal do cotilédone, quando em fase de ativa de utilização, isto é, entre 24 e 72 horas de germinação (figs. 15, 16, 17 e 18). Os inibidores de tripsina tendem a desaparecer por completo do hipocótilo-radícula, mas, entre 72 e 168 horas, parece haver aumento no epicótilo-plúmulas (figs. 15 e 17).

4. Inibidores de quimiotripsina

A Tabela III mostra os resultados obtidos na determinação dos IQ em diversas regiões da semente de feijão e da plântula.

De maneira análoga aos IT, os inibidores de quimiotripsina em sementes com 4 horas de embebição apresentam um gradiente de concentração que aumenta da secção distal para a secção proximal. Aqui também há aumento significativo tanto de concentração quanto de quantidade total de inibidores de quimiotripsina com 24 horas de germinação.

Após as primeiras 24 horas de germinação, o gradiente parece ser desfeito e a mobilização dos inibidores torna-se mais intensa, principalmente na secção proximal (figs. 19, 20, 21 e 22).

A mobilização continua até que, com 168 horas de germinação, os cotilédones ficam praticamente exauridos de IQ. Esse resultado foi também confirmado pela técnica de coramento negativo.

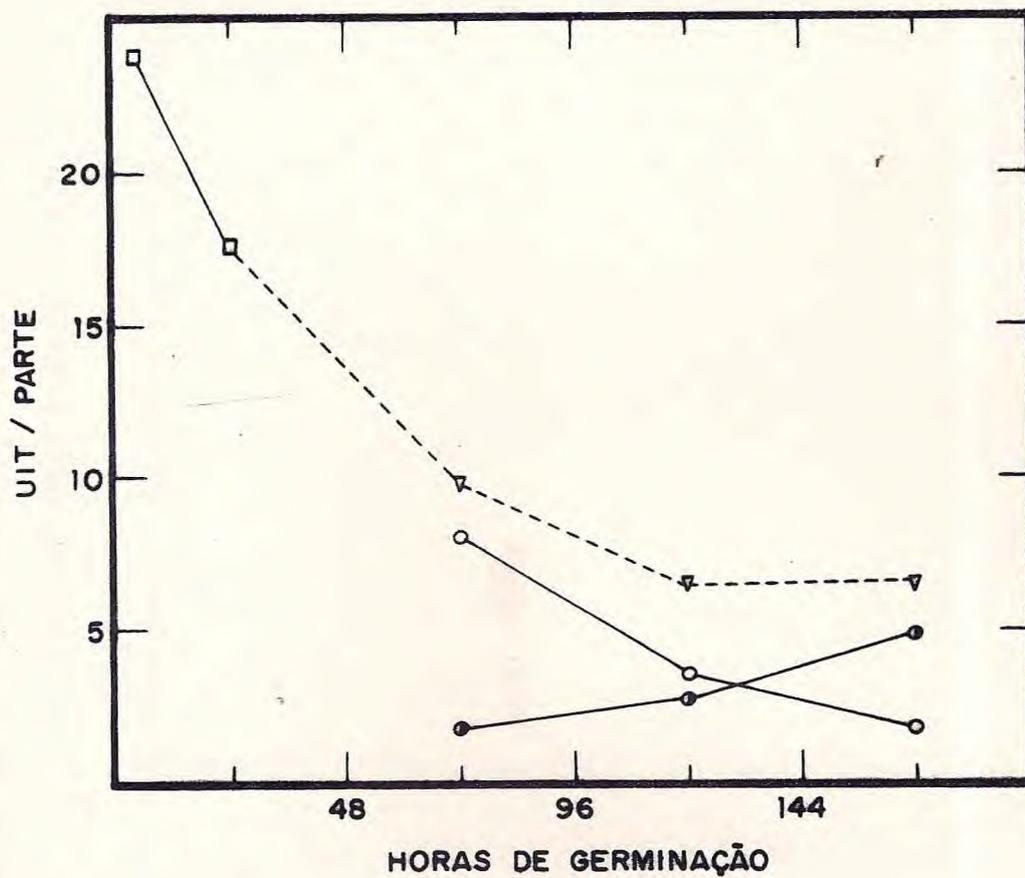


Figura 15 - Inibidores de tripsina do eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas. Eixo (—□—), HR (—○—), EP (—●—) e HR+EP (—▽—).

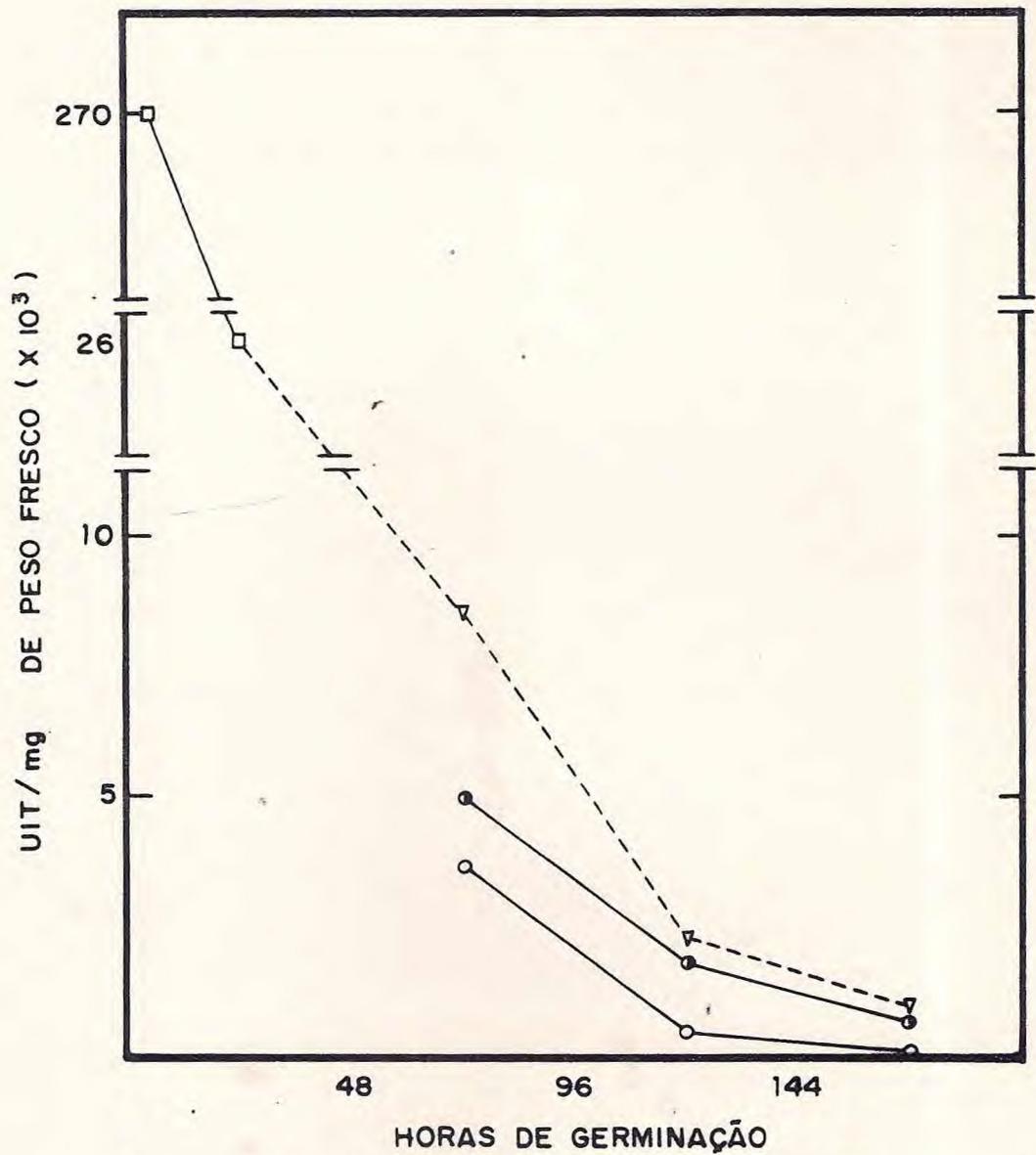


Figura 16 - Concentrações de inibidores de tripsina referidas a peso fresco do eixo, hipocôtilo-radícula e epicôtilo-plúmulas. Eixo (—□—), HR (—○—), EP (—●—) e HR+EP (—▽—).

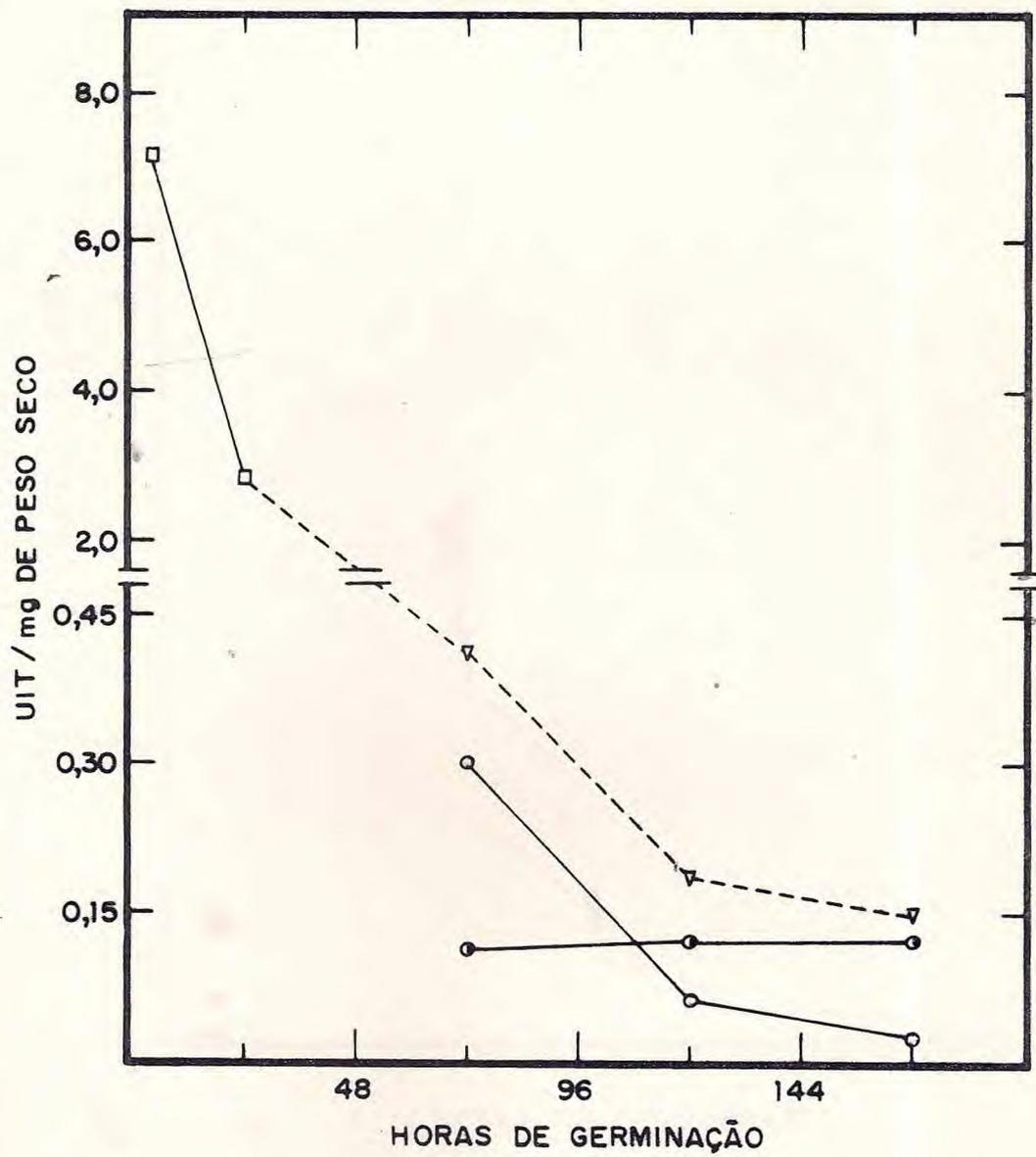


Figura 17 - Concentrações dos inibidores de tripsina referidas a peso seco do eixo, hipocôtilo-radícula e epicôtilo-plúmulas. Eixo (—□—), HR (—○—), EP (—●—) e HR+EP (—▽—).

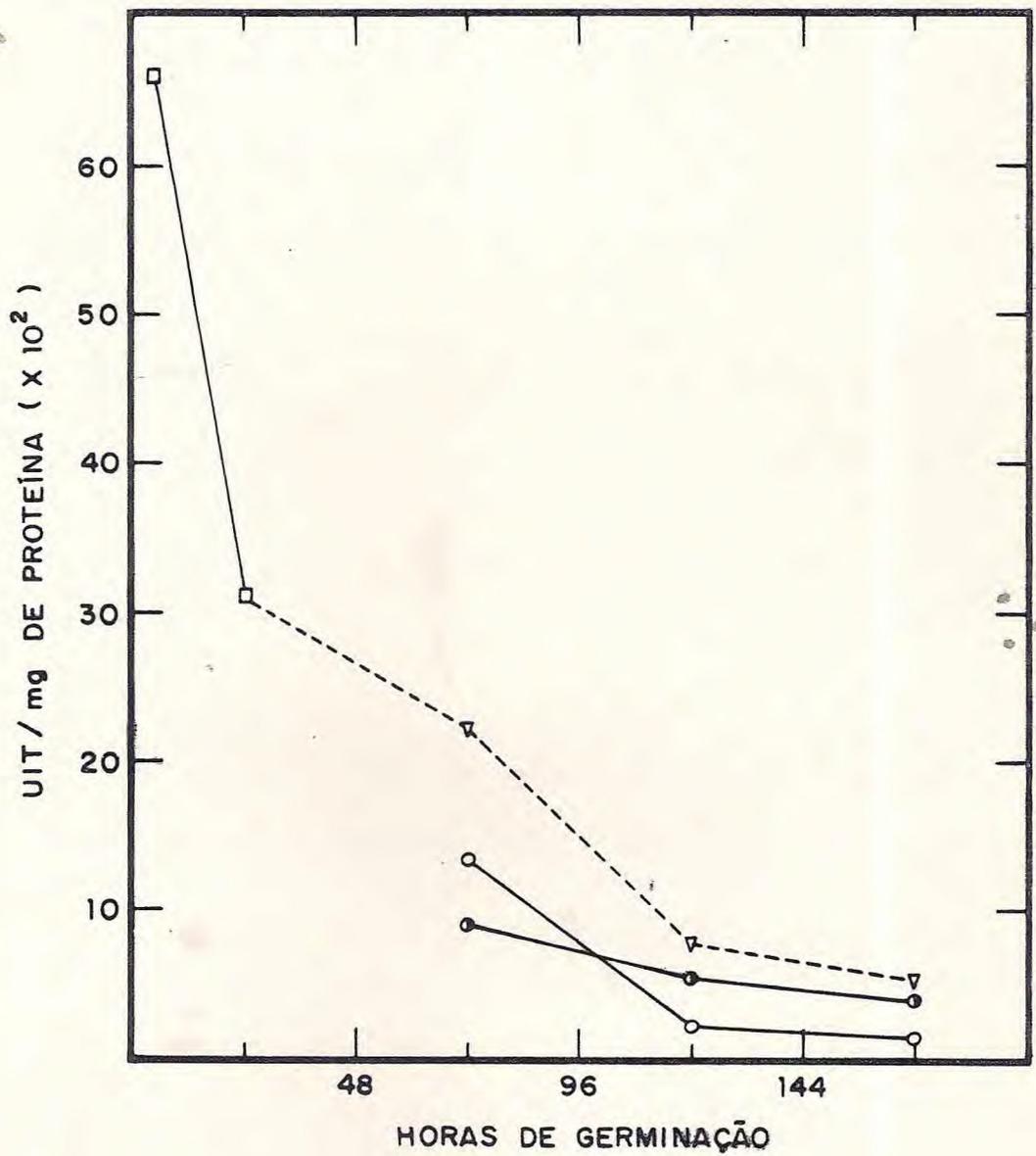


Figura 18 - Atividade específica de inibidores de tripsina do eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas. Eixo (—□—), HR (—○—), EP (—●—) e HR+EP (---▽---).

TABELA III

ATIVIDADES INIBITÓRIAS DA QUIMIOTRIPSINA

TEMPO DE GERMINAÇÃO	SECCOES	UIQ/PARTE			UIQ/MG DE PESO FRESCO			UIQ/MG DE PROTEÍNA			UIQ/MG DE PESO SECO		
		MÉDIAS	S	CV	MÉDIAS	S	CV	MÉDIAS	S	CV	MÉDIAS	S	CV
4 HORAS	SP	44,16	4,81	10,90	0,686	0,061	8,95	2,61	0,075	2,87	1,32	0,14	10,68
	SM	34,58	7,50	21,69	0,539	0,094	17,25	2,15	0,260	12,33	0,99	0,21	21,62
	SD	32,57	8,17	25,09	0,411	0,074	17,92	1,66	0,280	16,99	0,95	0,25	26,21
	EIXO	9,77	0,87	8,92	0,112	0,009	8,15	0,27	0,040	14,85	2,92	0,29	9,97
24 HORAS	SP	52,73	7,56	14,33	0,790	0,120	15,82	3,92	0,42	10,71	2,08	0,29	14,00
	SM	48,65	6,97	14,33	0,69	0,070	9,56	3,62	0,30	8,29	1,66	0,17	10,42
	SD	43,50	10,33	23,76	0,570	0,110	18,77	3,06	0,91	30,00	1,49	0,36	24,16
	EIXO	6,04	0,93	15,48	0,0089	0,002	23,60	0,107	0,0067	6,26	0,97	0,16	16,29
72 HORAS	SP	29,19	1,16	3,96	0,446	0,047	10,63	2,52	0,11	4,21	1,25	0,07	5,68
	SM	29,79	5,26	17,64	0,425	0,072	16,89	2,55	0,57	22,27	1,23	0,22	18,21
	SD	37,94	4,89	12,89	0,562	0,118	21,00	3,14	0,39	12,42	1,51	0,20	13,24
	HR	2,75	0,070	2,58	0,0012	0,0001	8,33	0,04	0,005	11,14	0,100	0,007	7,10
	EP	0,586	0,084	14,33	0,0016	0,0002	12,50	0,028	0,001	3,57	0,035	0,005	13,66
120 HORAS	SP	11,87	2,34	19,71	0,270	0,032	11,85	1,98	0,46	23,28	1,20	0,23	19,50
	SM	13,38	2,26	19,85	0,266	0,032	12,03	1,81	0,24	13,11	1,11	0,22	20,18
	SD	7,08	1,00	14,19	0,145	0,030	20,69	1,06	0,22	21,17	0,76	0,10	13,16
	HR	2,15	0,071	3,30	0,0003	0,00002	7,69	0,013	0,0007	5,38	0,037	0,001	2,70
	EP	1,58	0,038	2,40	0,001	0,00012	12,09	0,031	0,0047	15,10	0,067	0,002	2,54
168 HORAS	SP	0,955	0,21	21,57	0,044	0,0083	82,82	0,354	0,069	19,94	0,36	0,080	22,50
	SM	0,780	0,24	30,51	0,037	0,0098	26,41	0,302	0,077	25,50	0,31	0,100	32,26
	SD	0,908	0,20	22,46	0,042	0,0094	22,38	0,322	0,072	22,36	0,45	0,100	22,67
	HR	2,05	0,200	9,76	0,00018	0,00002	11,11	0,016	0,001	6,25	0,029	0,003	11,38
	EP	2,64	0,495	18,75	0,00040	0,0001	27,50	0,022	0,0048	21,82	0,069	0,013	18,84

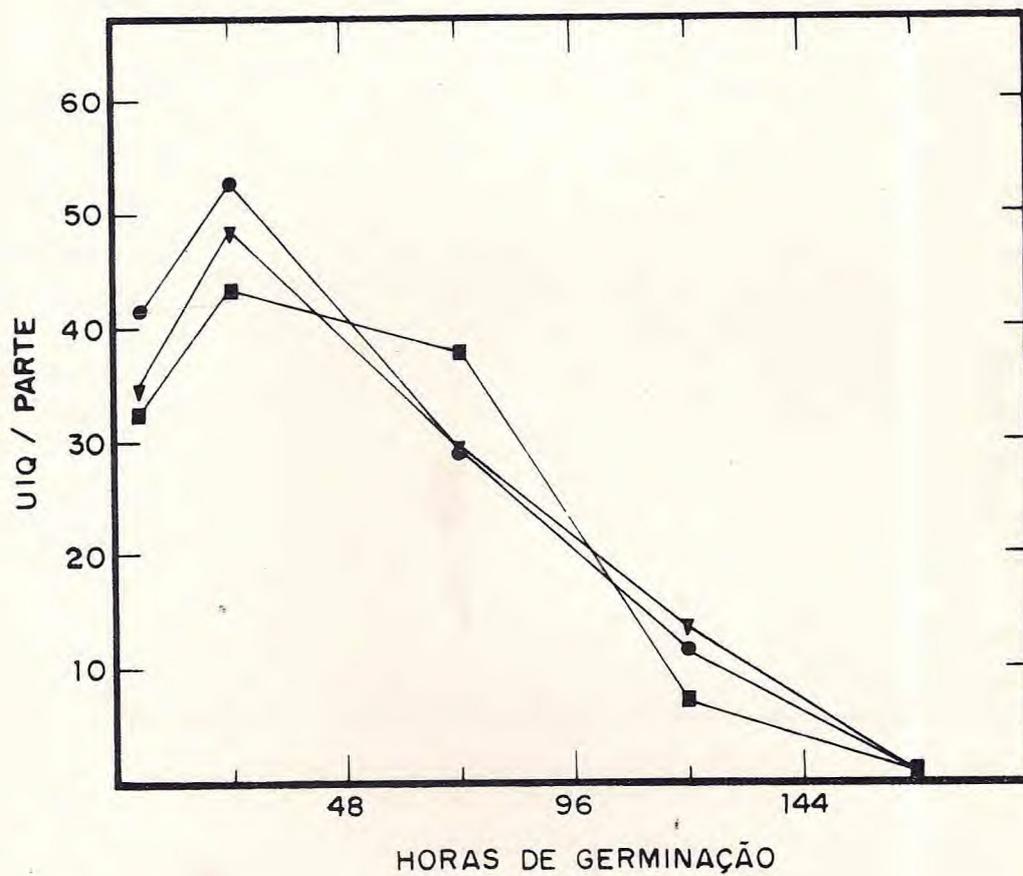


Figura 19 - Inibidores de quimiotripsina das secções cotiledonárias. SP (—●—), SM (—▼—) e SD (—■—).

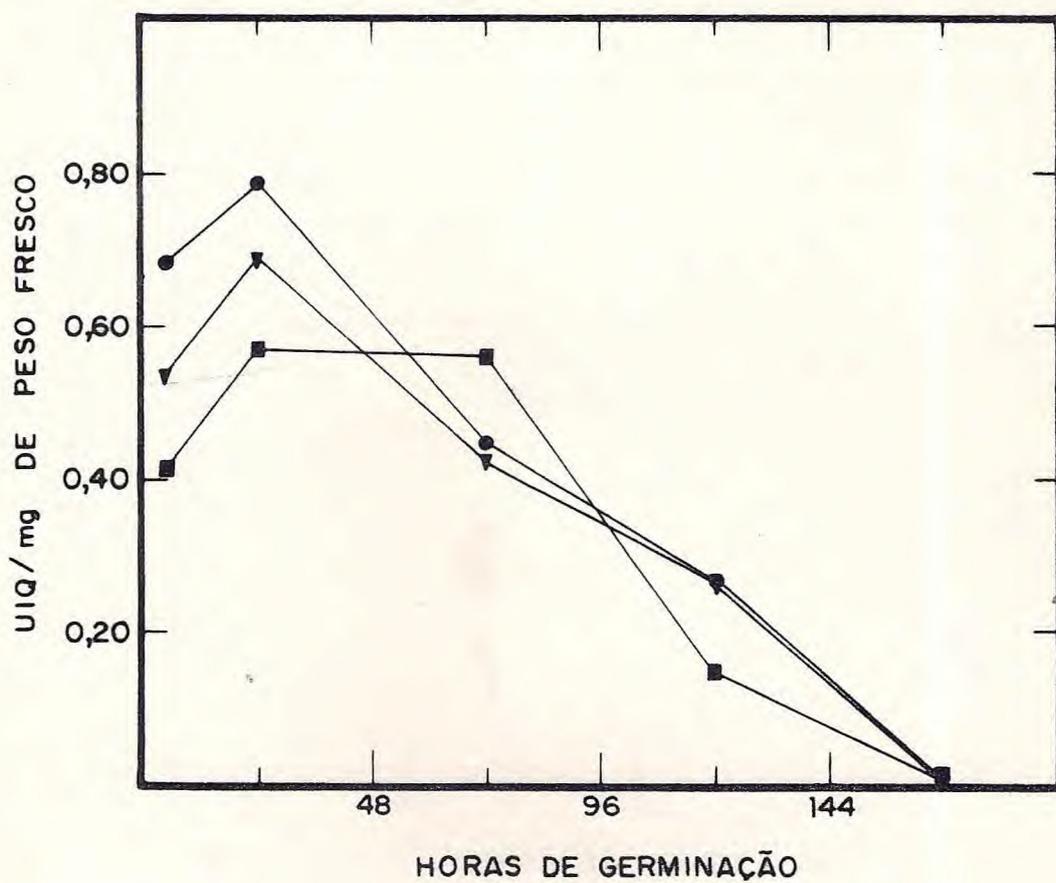


Figura 20 - Concentrações de inibidores de quimiotripsina referidas a peso fresco das secções cotiledonárias. SP (—●—), SM (—▼—) e SD (—■—).

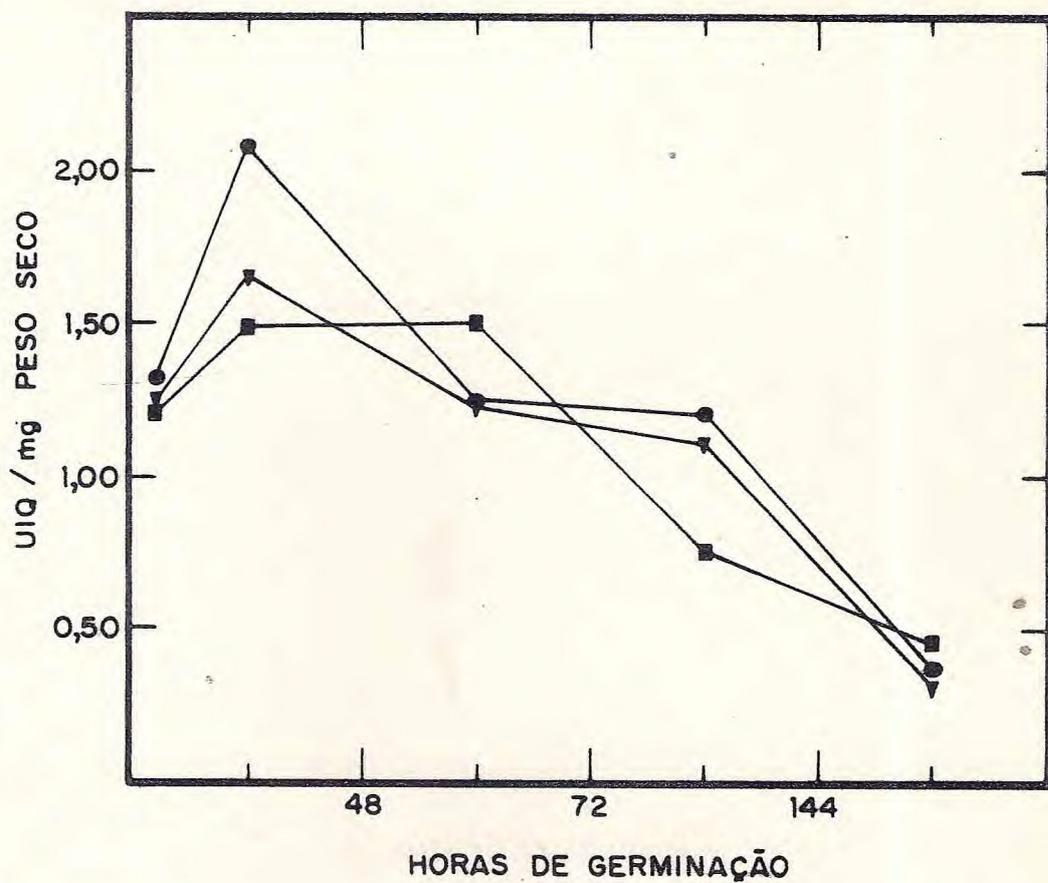


Figura 21 - Concentrações de inibidores de quimiotripsina referidas a peso se das secções cotiledonárias. SP (—●—), SM (—▼—) e SD (—■—).

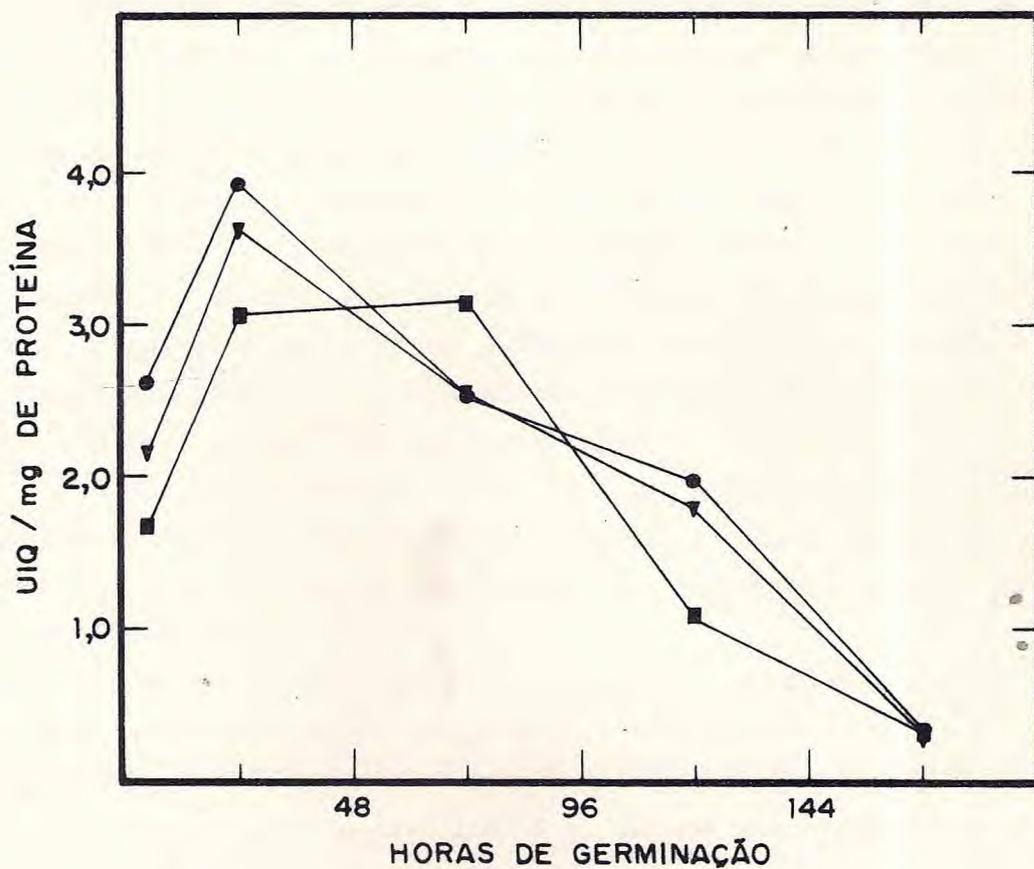


Figura 22 - Atividade específica de inibidores de quimiotripsina das secções cotiledonárias. SP (—●—), SM (—▼—) e SD (—■—).

Observando-se a fig. 21 (UIQ/mg peso seco), verifica-se que, de maneira análoga aos IT, a concentração dos inibidores de quimiotripsina decresce significativamente na secção proximal entre 24 e 72 horas, enquanto que, na secção distal, a concentração permanece praticamente constante. No período compreendido entre 72 e 120 horas, a concentração dos inibidores na SP praticamente não se modifica, enquanto que na secção distal decresce intensamente. Após 120 horas, a mobilização na secção proximal novamente se intensifica e, com 168 horas de germinação, todas as secções ficam praticamente exauridas de inibidores de quimiotripsina. A concentração dos IQ, quando referida a peso fresco (fig. 20), decresce na secção proximal de maneira quase linear, desde as primeiras 24 horas até as 168 horas de germinação. Na secção distal, a concentração só começa a diminuir após 72 horas de germinação. Esses resultados sugerem que os inibidores de quimiotripsina são mobilizados de um modo diverso de como o são os de tripsina.

A atividade específica dos IQ (fig. 22) decresce na secção proximal de maneira quase linear, desde as primeiras 24 horas até 168 horas de germinação, enquanto que, na secção distal, esse decréscimo só se verifica após 72 horas de germinação.

Como os IT, os inibidores de quimiotripsina sofrem intensa metabolização no eixo embrionário nas primeiras 24 horas de germinação (figs. 23, 24, 25 e 26). Os IQ tendem a desaparecer do hipocótilo-radícula, mas, entre 72 e 168 horas, - como no caso dos IT -, parece haver um aumento no epicótilo-plúmulas (figs. 23, 24, 25 e 26).

5. Disposição das nervuras cotiledonárias

A fig. 27 mostra cotilédones diafanizados, utilizando-se a técnica citada por Isaia (1959) (32). Nela se observa uma nervura principal que acompanha a concavidade dos cotilédones e inúmeras nervuras secundárias que partem da principal e mergulham para regiões opostas ao hilo.

A fig. 28 (A, B, e C) mostra cortes transversais feitos na secção mediana de cotilédones com 4 horas de embebição, 96 e 168 horas de germinação, respectivamente, corados com safranina através de técnicas usuais de

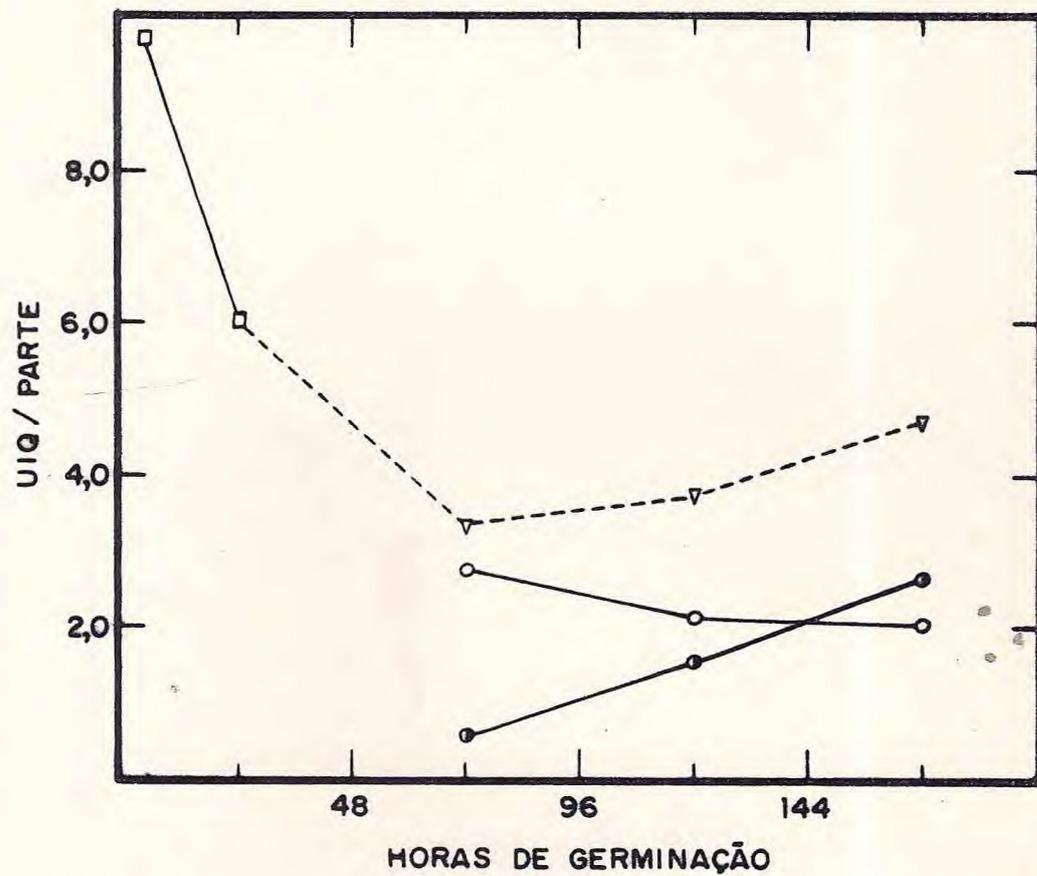


Figura 23 - Inibidores de quimiotripsina do eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas. Eixo (—□—), HR (—○—), EP (—●—) e HR+EP (—▽—).

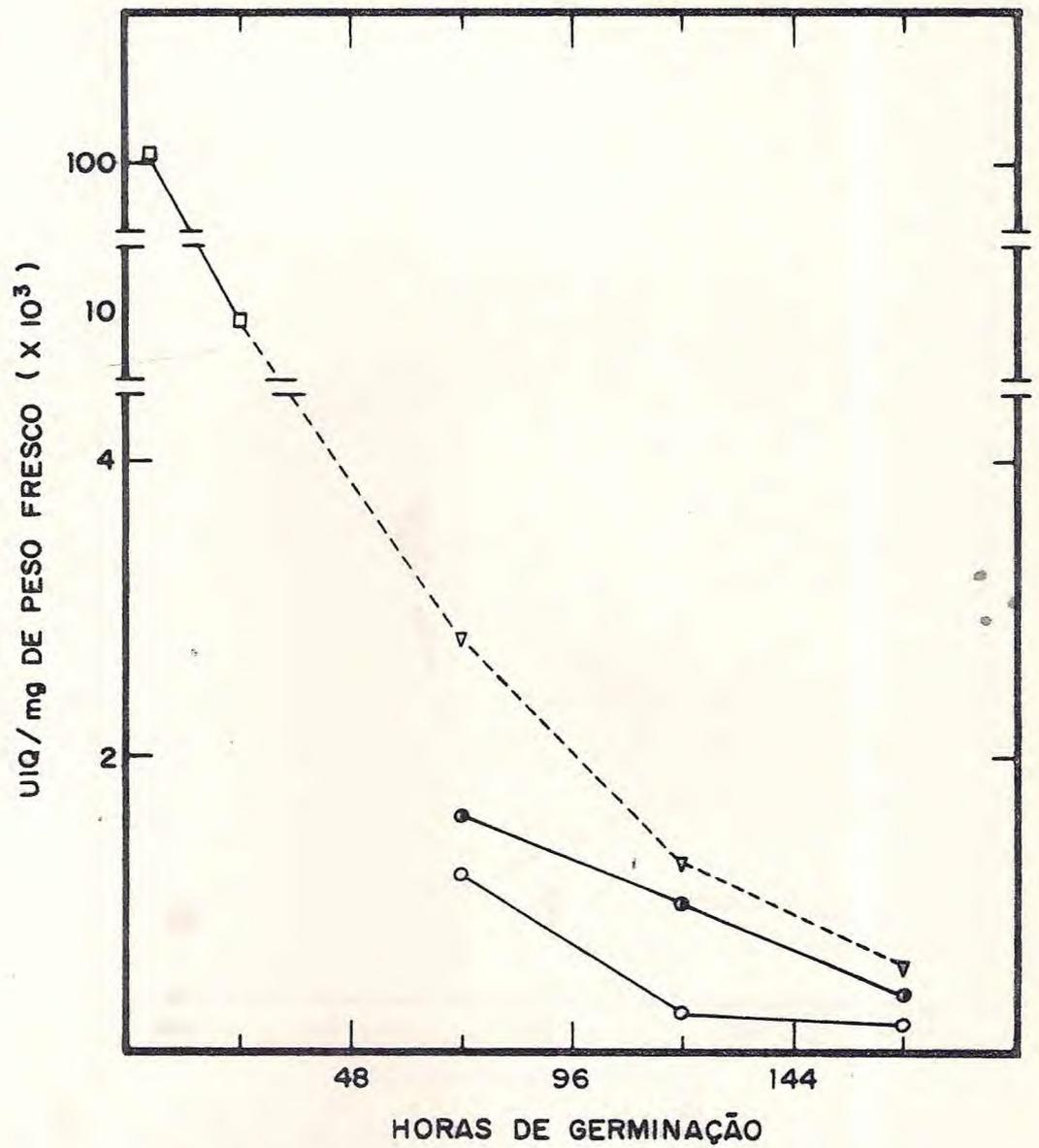


Figura 24 - Concentrações de inibidores de quimi tripsina referidas a peso fresco do eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas. Eixo (□), HR (○), EP (●) e HE+EP (▽).

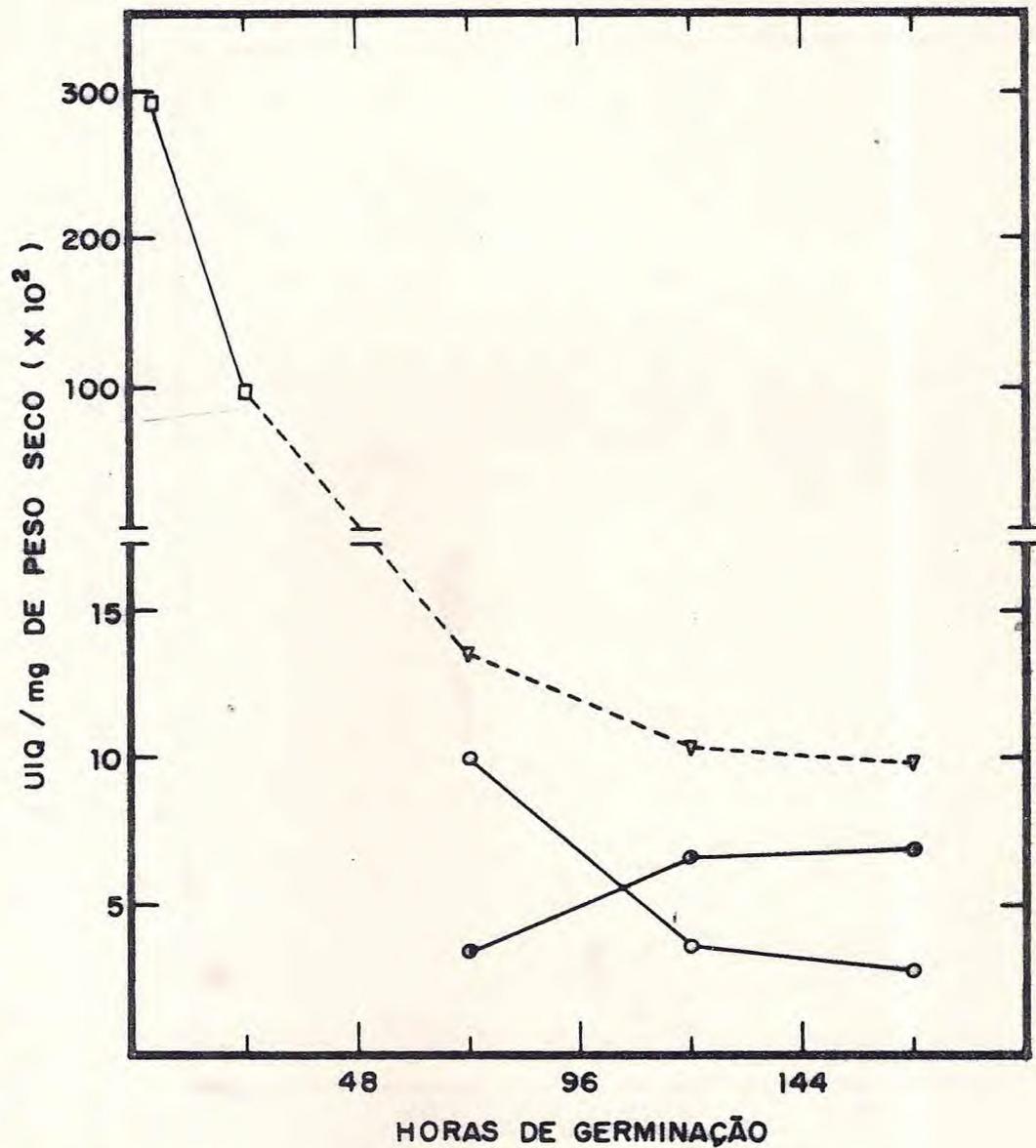


Figura 25 - Concentrações de inibidores de quimiotripsina referidas a peso seco do eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas. Eixo (—□—) , HR (—○—), EP (—●—) e HR+EP (—▽—).

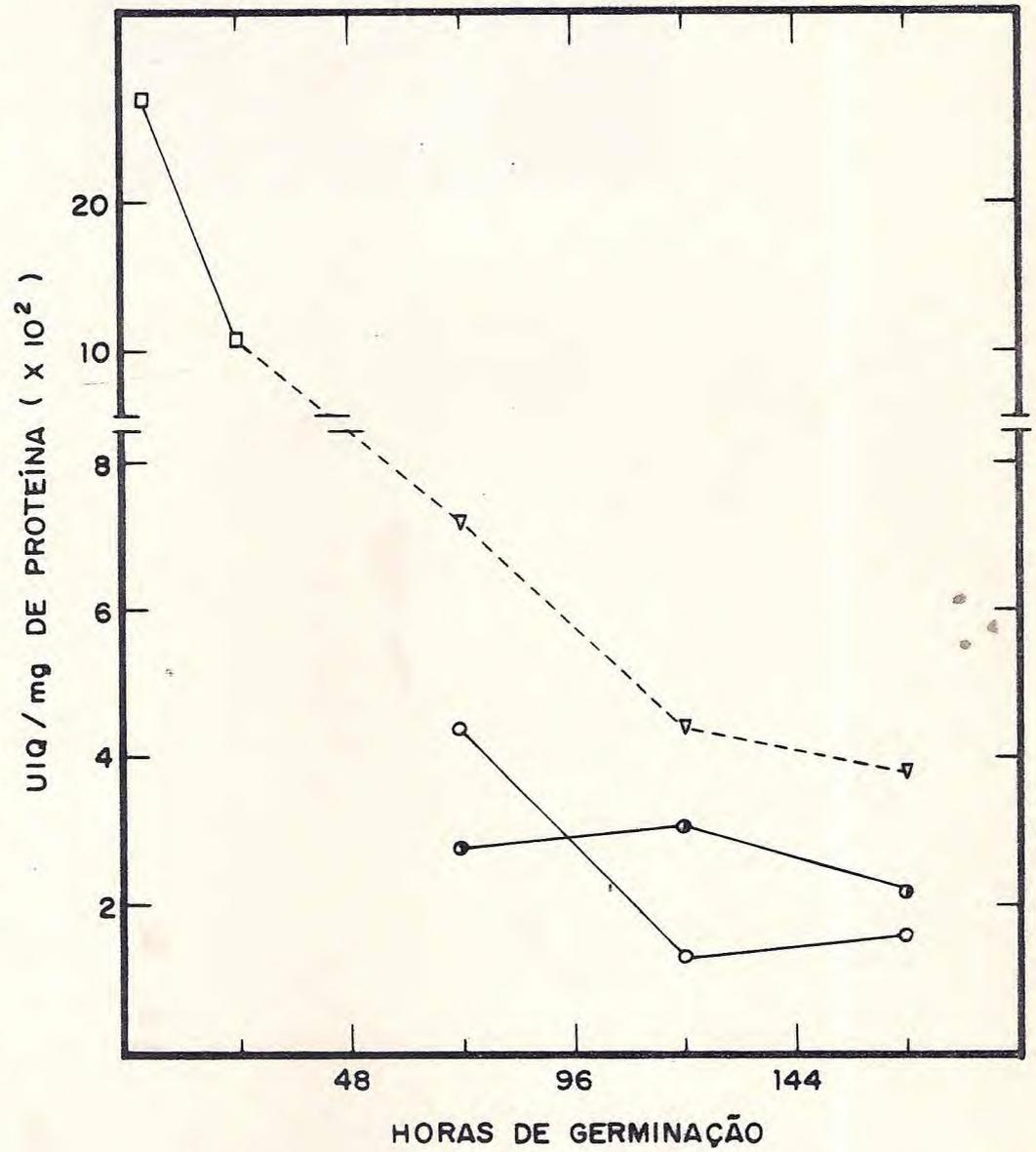


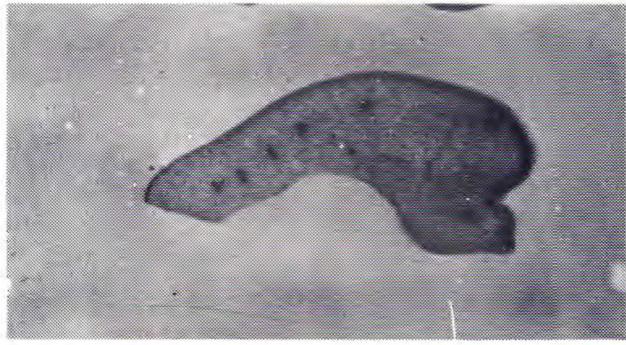
Figura 26 - Atividade específica de inibidores de quimiotripsina do eixo, hipocôtilo-radícula e epicôtilo-plúmulas. Eixo (—□—), HR (—○—), EP (—●—) e HR+EP (---▽---



Fig. 27. Cotilédone Diafanizado. Aumento 10x.

Figura 28 - Disposição dos feixes vasculares em cortes transversais de cotilédones.

- a. cotilédone com 4 horas de embebição
- b. cotilédone com 96 horas de germinação
- c. cotilédone com 168 horas de germinação.



A



B



C

Figura 28

coloração. Na referida figura, é salientada a disposição das nervuras principais e das nervuras secundárias (manchas negras).

6. Distribuição de proteínas

A fig. 29 (A, B e C) mostra cortes transversais da porção mediana de cotilédones de sementes com 4 horas de embebição, 96 e 168 horas de germinação, respectivamente, corados com azul de toluidina através de técnicas usuais de coloração. Na fig. 29 A, observa-se que as proteínas estão amplamente distribuídas em todas as regiões do corte. Na fig. 29 B, verificam-se regiões em que não mais existem proteínas (manchas claras). Verifica-se ainda que essas regiões correspondem aos locais mais distantes dos feixes vasculares. Finalmente, na fig. 29 C, nota-se que, com 168 horas de germinação, as proteínas estão restritas às regiões que correspondem aos feixes vasculares (figs. 27 e 28).

7. Mobilização transversal de inibidores

As figs. 30 (A, B, C e D) e 31 (A, B e C) mostram a mobilização dos inibidores de tripsina e quimiotripsina em cortes transversais da porção mediana de cotilédone, respectivamente. Os referidos cortes foram feitos em cotilédones de sementes com 4 horas de embebição e 96 e 168 horas de germinação. A técnica utilizada foi a de coramento negativo, desenvolvida em nosso laboratório e descrita anteriormente.

Nestas seqüências, observa-se que, com 4 horas de embebição (figs. 30 A e 31 A), os inibidores estão amplamente distribuídos em todas as regiões do cotilédone. As figs. 30 B e 31 B mostram que, com 96 horas, os inibidores estão restritos apenas a uma região próxima ao hilo. Essa região coincide com aquela por onde passa a nervura principal (figs. 27 e 28 A, B e C) e coincide também com uma região cujo teor de proteínas foi mostrado ser alto (fig. 29 A, B e C). Em alguns cortes de cotilédones com 96 horas de germinação, os inibidores, além de aparecerem na nervura principal, aparecem também nas nervuras secundárias (fig. 30 C). Finalmente, as

Figura 29 - Mobilização das proteínas em cortes transversais de cotilédones.

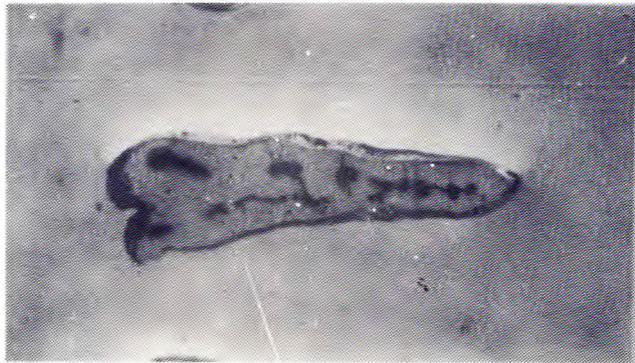
- a. cotilédone com 4 horas de embebição
- b. cotilédone com 96 horas de germinação
- c. cotilédone com 168 horas de germinação.



A



B



C

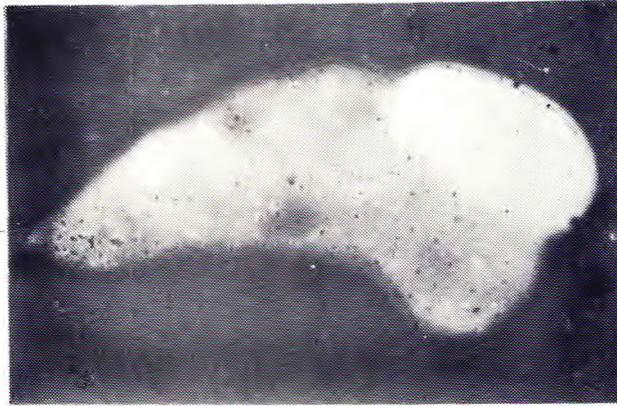
Figura 29

Figura 30 - Mobilização de inibidores de tripsina em cortes transversais de cotilédones. Aumento 10 x.

- a. cotilédone com 4 horas de embebição
- b. cotilédone com 96 horas de germinação
- c. cotilédone com 96 horas de germinação
- d. cotilédone com 168 horas de germinação



A



B



C



D

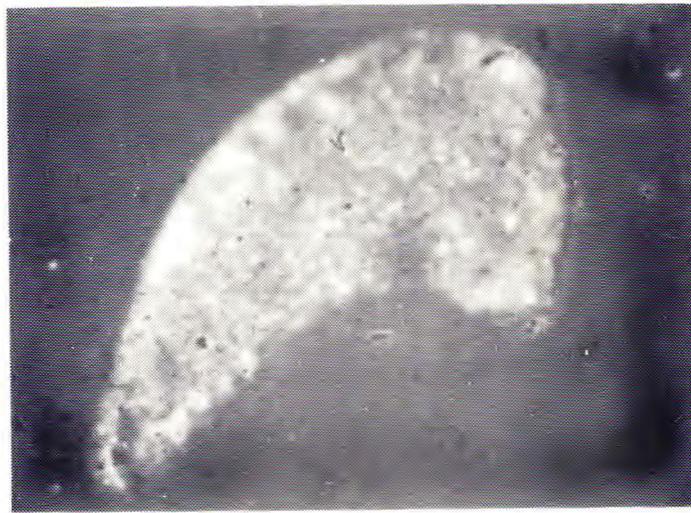
Figura 30

Figura 31 - Mobilização de inibidores de quimiotripsina em cortes transversais de cotilédones. Aumento 10 x.

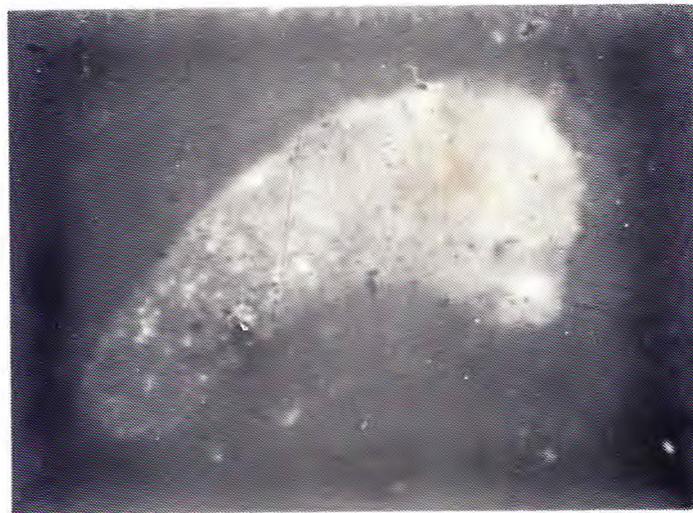
a. cotilédone com 4 horas de embebição

b. cotilédone com 96 horas de germinação

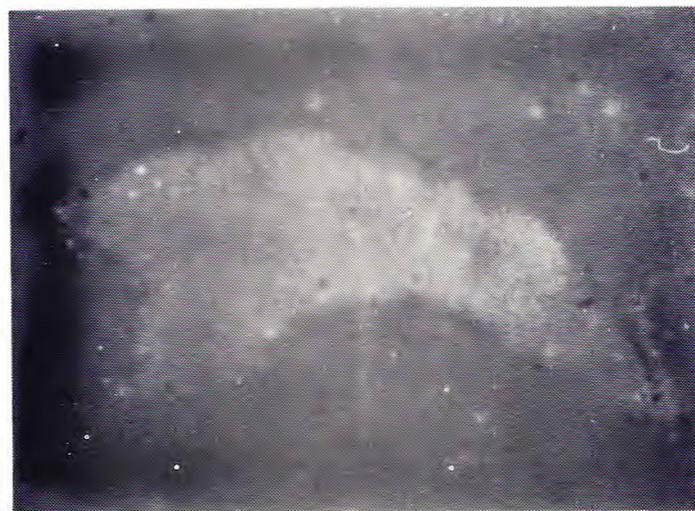
c. cotilédone com 168 horas de germinação.



A



B



C

Figura 31

figs. 30 D e 31 C mostram que, com 168 horas, os inibidores não são mais detectados. Com esse tempo de tratamento, observa-se somente uma leve impressão no gel causada provavelmente pelas paredes celulares.

IV. DISCUSSÃO

A mobilização das proteínas de reserva começa desde as primeiras horas de germinação, quando ela é mais intensa, até o estabelecimento da plântula (Tabela II, Fig. 9). Entretanto, o peso fresco das secções cotiledonárias permanece constante até 72 horas de germinação (Tabela I, Fig. 5). Esse fato provavelmente deve-se ao processo de absorção d'água que parece compensar, em peso, a mobilização das proteínas e de outras reservas (33). Determinando-se o peso seco das SP, SM e SD, mostramos (Tabela I, Fig. 6) haver um decréscimo em peso, justificado pela mobilização das proteínas de reserva armazenadas nos cotilédones e certamente pela mobilização de outras reservas, como o amido (33) (Tabela II, Fig. 9).

A metabolização das proteínas no eixo, nas primeiras 24 horas, é intensa, entretanto, os pesos frescos e secos aumentam significativamente. Neste caso, explica-se o ocorrido pelo fato de que, durante a germinação, ocorre síntese tanto de proteínas estruturais, não solúveis, às custas das proteínas de reserva, como de inúmeras outras substâncias que sobrepõem, em peso, as proteínas. No hipocótilo-radícula e no epicótilo-plúmulas ocorre algo semelhante (Tabelas I e II, Fig. 10).

Nas três secções cotiledonárias (SP, SM e SD), as proteínas se distribuem igualmente em todas as fases de germinação (Tabela II), sendo que, com 168 horas de germinação, somente 50% das proteínas de reserva tinham sido mobilizadas, talvez porque, após as 72 horas de germinação, a plântula já estivesse fotossintetizando.

O feijão de corda cv. seridó apresenta atividade inibitória em suas diferentes partes — cotilédones, eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas — em todos os estágios de germinação nas condições dos experimentos, existindo pronunciadas diferenças na distribuição e no comportamento dos inibidores. As diferenças na distribuição e no comportamento sugerem que esses inibidores desempenham funções também diferentes. Esses dados estão de acordo com os de Sohnie e colaboradores (34, 35, 36), Pusztai (25) e Ryan (4).

Apesar da grande mobilização das proteínas nas primeiras 24 ho

ras, os inibidores de tripsina aumentam em concentração, em atividade específica e em conteúdo total de inibidor. Resultado comparável ao obtido por Pusztai para "Kidney bean" (25), sendo que aí a quantidade de inibidor permanece constante até o quarto dia, somente aumentando sua concentração após o quinto dia de germinação.

Esses dados sugerem que, provavelmente, houve uma maior solubilização dos inibidores devido talvez à destruição de complexos formados durante o desenvolvimento, principalmente na secção distal (Figs. 11, 12, 13 e 14). Essa explicação justifica também o desaparecimento do gradiente de inibidores existentes nos cotilédones de sementes com 4 horas de embebição, bem como sugere que essas moléculas possam exercer um papel de proteção ou inibição de proteases endógenas ou ambos, sendo esses complexos desativados logo nas primeiras 24 horas, quando as enzimas são chamadas a exercerem suas funções fisiológicas (Tabela II, Figs. 9, 11, 12, 13 e 14).

Intensa mobilização dos inibidores de tripsina ocorre após 24 horas, quando o conteúdo total de inibidores (UI/parte) decresce linearmente (Fig. 11). A concentração dos inibidores (UI/mg peso seco) (Fig. 13) na SP sofre um decréscimo após 24 e até 72 horas, enquanto que, nas demais secções (SM e SD), não varia estatisticamente. Da mesma maneira que para os inibidores de "Kidney bean" (25), a concentração dos inibidores do feijão de corda sofre um aumento durante a germinação em todas as suas secções. Tal aumento, no presente caso, se efetua após o terceiro dia. Entretanto, a partir das 120 horas, os inibidores são intensamente mobilizados, ficando a mobilização praticamente concluída ao fim das 168 horas de germinação.

Nesta fase, nossos resultados diferem daqueles encontrados por Pusztai (25), onde a concentração de inibidores só começa a decrescer em estágios posteriores da germinação; isto pode ser explicado pelo fato de se tratar de espécies genericamente diferentes. A concentração, quando referida a peso fresco (UI/mg peso fresco) (Fig. 12), decresce logo a partir das primeiras 24 horas, já que o peso fresco permanece constante até 72 horas de germinação (Fig. 5).

A atividade específica dos inibidores de tripsina decai lentamente das 24 até as 120 horas (Fig. 14), durante uma fase de lenta mobiliza-

ção de proteínas (Fig. 9). Esses resultados parecem concordar com os de Xavier Filho (18), embora exista um atraso de 48 horas para o decréscimo da atividade específica no presente caso. Das 120 as 168 horas, entretanto, a atividade decresce abruptamente, enquanto a mobilização de proteínas decresce mais lentamente. Podemos sugerir, portanto, que, nesta última fase, os inibidores de tripsina são mobilizados preferencialmente com relação a outras proteínas, podendo, neste caso, estarem funcionando como reserva proteica, talvez fornecendo aminoácidos sulfurados, como sugeriu Puzstai (25), para suprir as necessidades fisiológicas da planta.

No eixo observa-se um grande decréscimo dos inibidores de tripsina nas primeiras 24 horas, sugerindo talvez que esses inibidores estavam desempenhando um papel protetor das proteinases endógenas ou de proteínas de reserva rapidamente metabolizadas. Entre 72 e 168 horas os inibidores tendem a desaparecer do hipocótilo-radícula, à medida que, no epicótilo-plúmulas, essas proteínas vão aumentando, ao contrário do que acontece nas folhas da batata doce, "green gram" e "asiatic yam", onde eles diminuem à medida que a folha envelhece (36). Esses resultados sugerem provável síntese de inibidores no epicótilo-plúmulas (Figs. 15 e 17).

Similarmente aos IT, os inibidores de quimiotripsina parecem aumentar sua solubilidade nas primeiras 24 horas de germinação, provavelmente devido à destruição dos complexos enzima-inibidor. Também nos IQ, com a solubilização, o gradiente observado em cotilédones de sementes com 4 horas de germinação, fica então desfeito. Do mesmo modo, os inibidores de quimiotripsina parecem desempenhar funções idênticas àquelas propostas para os IT (Figs. 19, 20, 21 e 22).

A concentração dos IQ (UIQ/mg peso seco) começa a diminuir linearmente a partir das primeiras 24 horas de germinação, indicando que há uma metabolização mais intensa desses inibidores, quando comparados aos IT (Figs. 13 e 21).

A atividade específica dos IQ, ao contrário da dos IT, cai progressivamente logo a partir das 24 horas até as 168 horas de germinação, confirmando haver mobilização preferencial desses inibidores com relação aos de tripsina e mesmo com relação a outras proteínas (Figs. 14 e 22).

No eixo, os inibidores de quimiotripsina têm comportamento semelhante aos IT, provavelmente desempenhando idênticas funções fisiológicas. No hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas, o comportamento dos IQ também é idêntico ao dos IT (Figs. 23, 24, 25 e 26).

Na Fig. 29 seqüência fotográfica A, B e C, vemos que, durante a germinação, há um desaparecimento gradual das proteínas de cada lado dos cotilédones adjacentes ao hilo, na periferia e nas células mais distantes dos feixes vasculares. Esse tipo de mobilização foi visto anteriormente por Harris e Chrispeels (37) para *Vigna unguiculata* e assemelha-se à mobilização protéica de "mung bean" (*Phaseolus aureus* = *Vigna radiata*) (38). Esses resultados também confirmam e estendem as observações feitas por Yomo e Taylor (39) e por Opik (40), respectivamente, de que a atividade das proteases e a perda das proteínas de reserva do *Phaseolus vulgaris* é mais intensa nas células mais distantes dos feixes vasculares, porém difere pelo fato de a proteólise e o desaparecimento das proteínas serem altos perto da periferia. Neste particular, nossos resultados confirmam e estendem os de Smith e Flynn (citado em 37) para o *Pisum arvense*. Nota-se ainda, na seqüência fotográfica, uma grande concentração de proteínas no interior dos feixes vasculares, fato que sugere ser a mobilização protéica por ali processada.

A mobilização dos IT e dos IQ parece também ser feita através das nervuras cotiledonárias. De acordo com as seqüências fotográficas (Figs. 30, A, B, C, e D e 31 A, B e C), nota-se que os últimos locais do cotilédone em que os inibidores desaparecem, correspondem a um ponto em que há grande concentração de proteínas (Fig. 29 B) e ao local em que passa a nervura principal (Figs. 27 e 28 A, B e C).

A distribuição da atividade anti-tríptica e anti-quimiotríptica e sua mobilização durante a germinação parecem sugerir uma dualidade de funções para os inibidores de tripsina e quimiotripsina. Aparentemente, durante as primeiras horas de germinação, os inibidores são liberados de complexos pré-existentes, os quais poderiam estar protegendo ou inibindo proteases no início dos processos germinativos. Os inibidores seriam, depois disso, metabolizados rapidamente com maior intensidade na porção proximal e no eixo embrionário, onde este processo parece ser exclusivo.

A mobilização dos inibidores se dá, aparentemente, da porção distal para a porção proximal do cotilédone no sentido longitudinal e, transversalmente, das regiões opostas ao hilo e em direção à nervura principal. Este quadro se ajustaria a uma função de reserva para estas proteínas onde elas forneceriam aminoácidos essenciais — provavelmente cisteína — ao desenvolvimento da plântula.

V. CONCLUSÕES

1. Foram detectadas atividades anti-tríptica e anti-quimiotríptica em diferentes partes — cotilédones, eixo, hipocótilo-radícula e epicótilo-plúmulas — de *Vigna sinensis* L (Savi) cv. seridô em todos os estágios de germinação nas condições dos experimentos;

2. um gradiente de inibidores de tripsina e quimiotripsina, que aumenta de SD para SP, foi detectado em cotilédones de sementes com 4 horas de embebição;

3. ao final das primeiras 24 horas, foi verificado um aumento significativo nos IT e IQ com relação aos níveis de 4 horas;

4. a mobilização dos inibidores de tripsina e quimiotripsina fica praticamente concluída até as 168 horas de germinação;

5. a proteólise nos cotilédones inicia-se pela periferia, de cada lado adjacente ao hilo e nas células mais distantes dos feixes vasculares, simultaneamente;

6. o último local em que desaparecem as proteínas de reserva e as atividades inibitórias, corresponde justamente ao local em que passa a nervura principal do cotilédone. Esse fato sugere que a mobilização das proteínas e inibidores é processada por ali;

7. diferenças na distribuição e no comportamento dos inibidores de tripsina e quimiotripsina sugerem que essas substâncias desempenham funções também diferentes.

- 1 - Vogel, R., Trautschold, I. and Werle, E. 1968. Natural proteinase inhibitors. Academic Press, New York.
- 2 - Liener, I. E. and Kakade, M. L. 1969. Protease inhibitors in toxic constituents of plant foodstuffs (I. E. Liener, ed.), pp. 7-68, Academic Press, New York.
- 3 - Pusztai, A. 1968. General properties of a protease inhibitor from the seeds of Kidney bean. *European J. Biochem.* 5, 252-259.
- 4 - Ryan, C. A. 1973. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants in *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24, 173-196.
- 5 - Richardson, M. 1977. The proteinase inhibitors of plants and microorganisms. *Phytochemistry*, 16, 159-169.
- 6 - Laskowski, M. and Laskowski, Jr., M. 1954. Naturally occurring trypsin inhibitors in *Adv. Prot. Chem.* (C. Anfinsen, M. Anson, K. Bailey, and J. Edsall, Eds.), Vol. 9, pp. 203-242, Academic Press, New York.
- 7 - Belitz, H. D., Kaiser, K. P. and Santarius, K. 1971. Trypsin and α -chymotrypsin inhibitors from potatoes: isolation and some properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 420-427.
- 8 - Iwasaki, T., Kiyohara, T. and Yoshikawa, M. 1971. Purification and partial characterization of two different types of proteinase inhibitors (inhibitors II-a and II-b) from potatoes. *J. Biochem.*, 70, 817-826.
- 9 - Melville, J. C. and Ryan, C. A. 1972. Chymotrypsin inhibitor I from potatoes. Large scale preparation and characterization of its subunit components. *J. Biol. Chem.* 247, 3445-3453.
- 10 - Haynes, R. and Feeney, R. E. 1967. Fractionation and properties of trypsin and chymotrypsin inhibitors from Lima bean. *J. Biol.* 242, 5378-5385.
- 11 - Frattali, V. 1969. Soybean inhibitors III. Properties of a low molecular weight soybean proteinase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 244, 274-280.
- 12 - Kowalski, D., Leary, T. R., Mckee, R. E., Sealock, R. W., Wang, D. and Laskowski, Jr., 1974. Replacements, insertions, and modifications

- of amino acids residues in the reactive site of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). Bayer-Symposium V "Proteinases Inhibitors", 311-324.
- 13 - Royer, A. 1975. Inhibiteurs d'enzymes protéolytiques et protéases des graines in les protéines des graines (J. Miège, ed.), pp. 159-201. Genève.
 - 14 - Laskowski, Jr., M. and Sealock, R. W. 1971. Protein proteinase inhibitors-molecular aspects in the enzymes (P. D. Boyer eds.), 3rd ed., vol. 3, pp. 375-473, Academic Press, New York.
 - 15 - Kirse, M. and Mikola J. 1971. Occurrence of proteolytic inhibitors in various tissues of barley. *Planta* 96, 281-291.
 - 16 - Royer, A., Miège, M. N., Grange, A., Miège, J. et Mascherpa, J. M. 1974. Inhibiteurs anti-trypsine et activités protéolytiques des albumines de graine de *Vigna unguiculata*. *Planta* 119, 1-16.
 - 17 - Royer, A. 1975. Activités protéolytiques et antitrypsine des graines de *Vigna unguiculata*: repartition et interaction. *Phytochemistry*, 14, 915-919.
 - 18 - Xavier Filho, J. 1973. Trypsin inhibitors during germination of *Vigna sinensis* seeds. *Physiol. Plant.* 28, 149-154.
 - 19 - Liener, Irvin E. 1961. Toxic factors in edible legumes and their elimination. *American J. of Clinical Nutr.*, 11, 281-298.
 - 20 - Pusztai, A. 1967. Trypsin inhibitors of plant origin, their chemistry and potential role in animal nutrition. *Nutr. Abstr. Rev.* 37, 1-9.
 - 21 - Mayer, A. M. and Shain, Y. 1974. Control of seed Germination in *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25: 167-193.
 - 22 - Dechary, J. M. 1970. Seed proteases and protease inhibitors. *Econ. Bot.* 24, 113-122.
 - 23 - Shain, Y., Mayer, A. M. 1965. Proteolytic enzymes and endogenous trypsin inhibitor in germinating lettuce seeds. *Physiol. Plant.* 18: 853-859.
 - 24 - Gennis, L. S. and Cantor, C. R. 1976. 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.

- 25 - Puzstai, A. 1972. Metabolism of trypsin-inhibitor proteins in the germinating seeds of Kidney bean. (*Phaseolus vulgaris*). *Planta* 107, 121-129.
- 26 - Goa, J. 1953. A microbiuret method for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 5, 218-222.
- 27 - Xavier Filho; j: 1969. Ação do calor sobre inibidor trípico de soja no estado sólido. Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 28 - Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *J. Gen. Physiol.* 30, 291-310.
- 29 - Lowry, O. H., Rosebrough, M. J., Farr, A.L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- 30 - Xavier Filho, J. 1974. Trypsin inhibitors in sorghum grain. *J. Food Sci.*, 39, 422-423.
- 31 - Uriel, J., and Berges, J. (1968). *Nature (London)* 218, 578-580.
- 32 - Isaia, D. 1959. Contribuição ao estudo anatômico de *Polygamum acre* H. B. K. *Rev. Fac. Farm. Santa Maria*, VI: (11): 33-48.
- 33 - Oota, Y.; Fujii, R., and Osawa, S. 1953. Changes in chemical constituents during the germination stage of a bean, *Vigna sesquipedalis*. *J. Biochem.*, 40, 649-661.
- 34 - Honavar, P. M. & Sohonie, K. 1955. Distribution of trypsin inhibitors in different organs of plants of sweet potato (*Ipomoea batata*) and green gram (*Phaseolus aureus*). - *J. Univ. Bombay* 248: 64-69.
- 35 - Sohonie, K. & Bhandarkar, A. P. 1954. Trypsin inhibitors in Indian foodstuffs: part I - Inhibitors in vegetable. - *J. Sci. Ind. Res.* 138: 500-503.
- 36 - Ambe, K. S. & Sohonie, K. 1956a. Studies in trypsin inhibitors in Indian foodstuffs: part III - Tripsin inhibitors in germinating double bean & Field bean & their growing plants. *J. Sci. Ind. Res.* 15c: 136-140.

- 37 - Harris, N., Chrispeels, M. J., Boulter D., 1975. Biochemical and histochemical studies on protease activity and reserve protein metabolism in the cotyledons of germinating cowpeas (*Vigna unguiculata*) - J. Exp. Botany 26: 544-554.
- 38 - Harris, N., and Chrispeels, M. J., 1975. Histochemical and biochemical observations on storage protein metabolism and protein body autolysis in cotyledons of germination Mung Beans. Phisiol. Plant. 56, 292-299.
- 39 - Yomo, H., and Taylor, M. P., 1973. Histochemical Studies on protease formation in the cotyledons of germinating bean seeds. Planta 112, 35-43.
- 40 - Opik, H. 1966. Changes in cell fine structure in the cotyledons of *Phaseolus vulgaris* L. during Germination. J. Exp. Bot. 17, 427-439.