UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

**Caracterização e Síntese dos Inibidores de
 α -Amilase do Feijão (*Phaseolus vulgaris*)**

ANTONIA MIWA IGUTI

Tese para obtenção do título de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. FRANCO M. LAJOLO

São Paulo

1993

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Franco M. Lajolo, pela orientação e ensinamentos durante o período envolvido na execução deste trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

A Universidade Estadual de Londrina, em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, pela concessão da licença.

A Profª Elza I. Ida pelo apoio constante e confiança.

A Gisele Paulli Rondello, pelas análises com o DSC e pelo auxílio sempre que se fez necessário.

Ao Celso Garcia, pelo auxílio no preparo dos anticorpos.

A Profª Ursula L. Marquez e à Rosa M. C. Barros, pela análise de aminoácidos.

A Dalva pelas sugestões, discussões e amizade.

A Beatriz, Elisena, Flávio, Elizabeth, Kazuko, Maria Inés e Mário José, pelo apoio.

A Márcia Nascimento Moraes, pelo eficaz apoio no laboratório.

Ao Edgar, por tudo.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos Srs.

Futoshi Iguti e Natal Pessoto

ANTONIA MIWA IGUTI

CARACTERIZAÇÃO E SÍNTESE DOS INIBIDORES DE α -AMILASE DE FEIJÃO
(*Phaseolus vulgaris*)

COMISSÃO JULGADORA

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

PROF. TITULAR FRANCO M. LAJOLO
Presidente e Orientador

PROF. DR. MARTHA MASSAKO TANABAKI
1º Examinador

PROF. DR. MANGEL TROYANO PUEYO
2º Examinador

PROF. TITULAR VADEMIR CARLOS S. GARBIERI
3º Examinador

PROF. DR. FLÁVIO FINARDE FILHO
4º Examinador

São Paulo, 30 de 04 de 1993.

SUMARIO

1- Introdução	1
2- Revisão da literatura	5
2.1- Função dos inibidores de alfa amilase	5
2.2- Origem dos inibidores de alfa amilase	8
2.3- Efeito dos inibidores de alfa amilase no organismo ..	10
2.4- Inibidores de cereais	12
2.5- Inibidores de alfa amilase do feijão	15
3- Objetivos	19
4- Materiais e métodos	20
4.1- Materiais	20
4.1.1- Matéria prima	20
4.1.2- Enzima	20
4.1.3- Resinas	20
4.1.4- Outros materiais	20
4.2- Métodos	21
4.2.1- Métodos utilizados nas duas partes do trabalho	21
4.2.1.1- Proteína	21
4.2.1.2- Atividade amilásica	21
4.2.1.3- Atividade inibidora da amilase	22
4.2.2- Técnicas utilizadas na caracterização dos	
inibidores	22
4.2.2.1- Extração e purificação dos inibidores	22
4.2.2.2- Eletroforese em meio alcalino	23
4.2.2.3- Determinação do peso molecular	23
4.2.2.4- Eletroforese em meio dissociante	23
4.2.2.5- Ponto isoelétrico	24

4.2.2.6-	Determinação dos açúcares	24
4.2.2.7-	Determinação do pH ótimo de interação entre a enzima e os inibidores	24
4.2.2.8-	Determinação da temperatura ótima de interação enzima-inibidor	25
4.2.2.9-	Estabilidade do inibidor a temperatura	25
4.2.2.10-	Estabilidade do inibidor a pH	25
4.2.2.11-	Composição de aminoácidos	26
4.2.2.12-	Calorimetria diferencial exploratória	26
4.2.2.13-	Estudos cinéticos da interação enzima- inibidor	26
4.2.2.13.1-	Estequiometria	26
4.2.2.13.2-	Constante de dissociação	27
4.2.3-	Técnicas utilizadas no acompanhamento do desen- volvimento dos grãos	27
4.2.3.1-	Plantio, coleta e preparo das amostras	27
4.2.3.2-	Umidade	28
4.2.3.3-	Proteína	28
4.2.3.4-	Desglicosilação do inibidor	28
4.2.3.5-	Preparo dos anticorpos	29
4.2.3.6-	Determinação do teor de inibidor	30
4.2.3.7-	Purificação dos inibidores extraídos de grãos em diferentes fases do desen- volvimento	30
5-	Resultados e discussão	31
5.1-	Caracterização	31
5.1.1-	Peso molecular	31
5.1.2-	Ponto isoelétrico	34

5.1.3-	Teor de carboidratos	36
5.1.4-	Estabilidade a temperatura e pH	38
5.1.5-	Condições ótimas para interação	40
5.1.6-	Composição de aminoácidos	44
5.1.7-	Análise térmica	46
5.1.8-	Cinética de inibição	46
5.1.8.1-	Estequiometria	46
5.1.8.2-	Constante de dissociação	49
5.2-	Acompanhamento da síntese dos inibidores	52
5.2.1-	Massa total e umidade	52
5.2.2-	Massa seca, proteína e atividade	57
5.2.3-	Massa de inibidor	64
5.2.4-	Purificação dos inibidores em diferentes fases do desenvolvimento do grão	68
6-	Conclusões	75
7-	Referências bibliográficas	76
8-	Resumo	89
9-	Abstract	90
10-	Resumo de figuras e tabelas	91
11-	Tabela de abreviaturas	92

1- INTRODUÇÃO

Os inibidores de α -amilase (IAs), assim como as lectinas e outros inibidores de enzimas digestivas, compõe um grande grupo de substâncias que podem ser classificadas como fatores antinutricionais. Os IAs estão presentes em animais (FOSSUM e WHITAKER, 1974), plantas (WHITAKER, 1988) e microrganismos (TAJIRI et al., 1983) e possuem naturezas químicas variáveis, que incluem carboidratos, peptídios e proteínas. A maioria dos trabalhos descreve inibidores extraídos de plantas, sendo que os primeiros publicados são antigos (CHIZASZCZ e JANICKI, 1933 em trabalho com o trigo, e BOWMAN, 1945, com feijão). Hoje, inúmeras publicações trazem informações sobre a detecção, purificação e caracterização dessas proteínas extraídas de trigo (O'CONNOR e McGEENEY, 1981; BUONOCORE et al., 1965; BAKER, 1989; SANCHEZ-MONGE et al., 1991), cevada (SANCHEZ-MONGE et al., 1986; SVENDSEN et al., 1986; LAZARO et al., 1988), triticales (IDA, 1986; ZAWISTOWSKA et al., 1989), centeio (GRANUM, 1978), sorgo (KUTTY e PATTABIRAMAN, 1986), milheto (SHIVARAJ et al., 1982; CAMPOS e RICARDSON, 1983; NAGARAJ e PATTABIRAMAN, 1985), milho (BLANCO-LABRA e ITURBE-CHINAS, 1981), arroz (FENG et al., 1991), feijão (POWERS e WHITAKER, 1977a,b; PICK e WOBER, 1978a,b; FRELS e RUPNOW, 1984), amendoim (IRSHAD e SHARMA, 1981), tubérculos (SHIVARAJ et al., 1979; SHARMA e PATTABIRAMAN, 1982), frutos (MODI e MATOO, 1970), sementes de melancia e abóbora, etc.

O interesse crescente nos IAs de vegetais é demonstrado pelo grande número de trabalhos publicados nos últimos anos. É consequência da possibilidade de serem utilizados em análises clínicas, na área agronômica e como agente terapêutico na área médica, sendo importantes também os possíveis efeitos causados por sua ingestão. Todavia, o destaque que vem recebendo se deve principalmente às indicações de que sua presença estaria relacionada com o mecanismo natural de defesa das plantas contra predadores (ALTABELLA e CHISPEELS, 1990; HUESING et al., 1991). A melhor forma de aplicação, entretanto, somente poderá ser encontrada após o conhecimento das estruturas e propriedades químicas dessas substâncias, sendo também fundamental o conhecimento dos mecanismos de ação nos vegetais onde se encontram e nos organismos que as ingerem.

As pesquisas com o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) são particularmente importantes para um país como o Brasil, por ser este um grande produtor e consumidor dessa leguminosa. Há no país vários grupos de pesquisa trabalhando com diferentes aspectos relacionados com o feijão, entre os quais incluem-se o nutricional, o bioquímico, o agronômico, e o relacionado com os fatores antinutricionais. Neste último estão enquadrados entre outros, os inibidores de tripsina, as lectinas e os IAs.

No Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP, os IAs vem sendo abordados sob diferentes pontos de vista. O primeiro trabalho publicado envolvendo a detecção de inibidores em triticales foi feito pelo grupo, através do desenvolvimento de uma técnica eletroforética

para identificação de IAs em géis de poliacrilamida-amilopectina (FINARDI FILHO e LAJOLO, 1984). Outros trabalhos foram feitos em seguida, envolvendo a purificação e caracterização desses inibidores (IDA, 1986; ROMANELLI et al., 1988). Apesar disso, a maioria dos trabalhos feitos pelo grupo envolvem inibidores extraídos do feijão, sendo que resultados relevantes tem sido obtidos.

No aspecto nutricional, estudos com animais normais e diabéticos demonstraram que um inibidor de α -amilase do feijão é capaz de reduzir a glicemia resultante da ingestão do amido, indicando que a amilase pode ser inibida também *in vivo*.

No aspecto da função, resultados obtidos através de experimentos utilizando sementes artificiais contendo inibidor de amilase purificado, sugerem essa proteína é capaz de reduzir o crescimento de carunchos do feijão e aumentar sua mortalidade, indicando que um caminho na obtenção de variedades mais resistentes pode envolver os inibidores de α -amilase.

No aspecto estrutural dos IAs de feijões, muitas informações foram obtidas. Entre elas, encontram-se as relacionadas com a purificação e propriedades desses compostos. Através de diferentes técnicas de purificação foi possível verificar que feijões podem conter uma ou mais frações inibidoras, sendo que o número de frações é uma característica dependente da variedade, não estando relacionada com a cor dos grãos.

Entre as diferentes características que esses inibidores apresentam, está a resistência ao aquecimento, responsável pela

classificação dessas proteínas em termossensíveis e termorresistentes.

Da fração termorresistente da variedade Rico 23, muitas informações já foram obtidas, entre as quais as referentes às propriedades físicas, químicas e cinéticas (LAJOLO e FINARDI FILHO, 1984; TANIZAKI et al., 1985; WHITAKER et al., 1988). A fração termossensível encontra-se parcialmente caracterizada, sendo que os estudos prosseguem. Além disso, já se encontram parcialmente desvendadas as estruturas primárias tanto da fração termossensível quanto da termorresistente da mesma variedade (FINARDI FILHO, 1990).

Este trabalho se enquadra basicamente neste último item, já que trata, em sua maior parte, da caracterização desses compostos. A escolha das variedades Jalo e Argentino para a caracterização dos inibidores teve como principais critérios, características de resistência ao aquecimento, e a presença de uma única fração inibidora. O objetivo principal dessas escolhas, foi o da obtenção de informações acerca dos inibidores quando presentes como fração única nos grãos, para posterior comparação com as dos mesmos quando presentes simultaneamente.

Um outro aspecto também abordado neste trabalho refere-se ao acompanhamento da síntese dos inibidores durante o desenvolvimento dos grãos nas variedades Jalo e Argentino, e para efeito de comparação, também da variedade Rico 23.

2- REVISÃO DA LITERATURA

Como já mencionado anteriormente, os IAs vem sendo estudados sob diversos aspectos, entre os quais o das possíveis funções fisiológicas, o nutricional e o das propriedades químicas e físicas. A seguir serão descritos com mais detalhes esses diferentes aspectos e os trabalhos que os envolvem.

2.1- FUNÇÃO DOS INIBIDORES DE ALFA AMILASE

Entre as possíveis funções que os IAs podem exercer, está a de controle da germinação. O argumento mais forte que fortalece essa hipótese baseia-se na existência de inibidores de α -amilases endógenas. A partir de grãos de milho (BLANCO LABRA e ITURBE-CHINAS, 1981), trigo (MUNDY et al., 1984) e centeio (TAUFEL et al., 1991) foram isolados inibidores com essa característica. Esses resultados levaram alguns autores a sugerirem que essas proteínas poderiam ser utilizadas no melhoramento genético de variedades de trigo utilizadas na panificação (MUNDY et al., 1984; HENRY et al., 1992).

Para outros pesquisadores, a atividade inibidora seria apenas casual e não refletiria qualquer função fisiológica relevante. Segundo esses pesquisadores, essas e outras proteínas teriam a função de transferência de lipídios. Essa possibilidade foi aventada, pelas semelhanças entre esses compostos apresentam.

BERNHARD e SOMERVILLE (1989) compararam as estruturas primárias de um IA de milho, PAPI (probable amylase protease inhibitor) de cevada, e proteínas de transferência de lipídios provenientes de milho, espinafre e mamona, e verificaram a existência de homologia sequencial significativa. Essa homologia, segundo esses autores, seria uma indicação de que essas proteínas teriam a mesma função.

Uma terceira possibilidade para a presença dessas proteínas nos vegetais, seria na função de conferir resistência ao grão. Essa possibilidade surgiu em função das diferentes afinidades que os inibidores possuem pelas amilases de variadas origens.

Em trigo, parece haver uma relação entre a função dos inibidores presentes e o processo evolutivo do grão. De acordo com BUONOCORE et al. (1985), as três famílias de inibidores de trigo (com pesos moleculares de 12, 24 e 60 kDa) seriam derivadas de um único gene ancestral, que seria o responsável pela codificação de uma sequência polipeptídica com peso molecular próximo a 12 kDa. Através da mutação, subfamílias desse gene teriam sido criadas, e seriam responsáveis pela síntese de polipeptídios capazes de se associarem formando estruturas diméricas e tetraméricas estáveis. O aparecimento destas novas estruturas estaria associado com a aquisição da capacidade de ação sobre outras amilases, já que enquanto os inibidores monoméricos são ativos principalmente sobre amilases de insetos, os diméricos e tetraméricos, além das de insetos, são ativos também sobre as amilases de mamíferos e aves. GATEHOUSE et al. (1986) sugeriram que o trigo não seria infestado pelo caruncho do feijão *Callosobruchus maculatus*, pela presença do

inibidor de α -amilase. Entretanto, esses mesmos autores sugerem que as atividades altas que alguns inibidores possuem em inibir α -amilases de insetos devem ser analisadas com cuidado, pois alguns insetos podem ter capacidade de digerir o inibidor, inativando-o.

No feijão, os estudos já realizados com os possíveis fatores responsáveis pela resistência à infestação por insetos não foram conclusivos. De acordo com JANSEN et al. (1976), a fitohemaglutinina estaria envolvida na especificidade das interações entre espécies de *Phaseolus* e seus predadores. Segundo esses autores, embora a fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* não proteja contra seus próprios predadores, dariam proteção contra insetos de outras espécies de *Phaseolus*. OSBORN et al. (1988), por outro lado, demonstraram a existência de uma associação entre os diferentes níveis de resistência de feijão e a presença de 4 variantes de arcelina, uma proteína presentes em espécies selvagens de *Phaseolus vulgaris*. Também ANTHONY et al. (1991) verificaram que tanto sementes artificiais quanto naturais contendo arcelina demonstraram resistência ao ataque por *Zabrotes subfasciatus*.

Ainda em estudo com o feijão (*Phaseolus vulgaris*), HUESING et al. (1991) sugeriram que o IA de feijão era o responsável pela resistência das sementes ao *Callosobruchus maculatus*, já que este caruncho não infesta essa espécie de feijão. ALTABELLA e CHRISPEELS (1990) sugeriram que a resistência de grãos de outras espécies poderia ser aumentada, pela inclusão do inibidor de α -amilase no código genético do vegetal. Através de modificação genética, esses autores conseguiram que um IA de

feijão capaz de atuar sobre amilase de insetos fosse expresso em sementes de tabaco.

2.2- ORIGEM DOS INIBIDORES DE ALFA AMILASE

O esclarecimento da origem dos inibidores de amilases seria um importante avanço na elucidação de sua função. Alguns autores descrevem proteínas com características estruturais semelhantes, mas diferentes funções inibidoras de enzimas hidrolíticas. É o caso das proteínas como homologia sequencial como no caso do IA/IS de trigo com IA/IS de cevada, IP de arroz e IT de soja (MUNDY et al., 1984). Outras proteínas possuem em comum a identidade imunológica. É o caso do IA/IS de cevada com CM2 de trigo (MUNDY et al., 1984) e IA/IS de cevada com IT de soja (SVENDSEN et al., 1986). Segundo esses autores, essas proteínas poderiam ter sido originalmente de reserva, e com o processo evolutivo se especializaram em duas diferentes funções inibidoras de enzimas hidrolíticas.

É provável que outras proteínas com homologia sequencial tenham sido derivadas do mesmo gene ancestral. Entre elas, estão do IA/IT de milho e IT de cevada; IA/IT de milho e IA de trigo; IA de trigo e IT de cevada (CAMPOS e RICHARDSON, 1983); a PAPI de cevada e IA de milho (SVENSSON et al., 1986); o IT de centeio e IT de cevada (LYONS et al., 1987); o IA de cevada e CMA, CM1 e CM2 (LYONS et al., 1987). Todas essas proteínas devem ser partes de uma mesma família de inibidores, possuindo atividade

sobre enzimas não relacionadas. Também poderiam fazer parte desta família, o IS e o IS/IT de milho (VAIDYANATHAM e VIRUPAKSHA, 1991), o IQ/IT e o IA/IT de milho (SHIVARAJ e PATTABIRAMAN, 1981; SHIVARAJ et al., 1982), os dois IA/IS de triticale (ZAWISTOWSKA et al., 1989), e o IA/IP de trigo (PAL et al., 1986). Essas proteínas devem ter sido originárias do mesmo gene ancestral e provavelmente teriam alguma relação com as proteínas de reserva. Essa possibilidade foi baseada na existência de homologia entre inibidores enzimáticos e proteínas de reserva. É o caso das CM (de trigo e cevada) e PR 2S provenientes de mamona e colza (SHERRY et al., 1984) e do IA 0,28 de trigo e PR de tremço (LILLEY e INGLES, 1986).

No feijão também pode ser identificado um fenômeno similar. Parece haver uma correlação entre a presença da arcelina e o teor de faseolina, a principal globulina de reserva do feijão (ANTHONY et al., 1991). Além disso, estudos feitos com as sequências de nucleotídeos mostraram uma relação entre as arcelinas e as lectinas do feijão (ANTHONY et al., 1991). Outros estudos demonstraram uma provável relação entre as lectinas e os inibidores de α -amilase. MORENO e CHRISPEELS (1989) apresentaram evidências de que o IA seria codificado por um mesmo gene que codifica a lectina. MORENO et al. (1990), por outro lado, verificaram a existência de homologia sequencial entre duas sequências aminoacídicas de um IA do feijão e uma sequência derivada do gene da LLP.

Muitos desses estudos são baseados em técnicas imunológicas. As semelhanças imunológicas indicam semelhanças

estruturais importantes. Esse fato foi identificado entre uma arcelina e a faseolina (ANTHONY et al., 1991), entre PHAs purificadas e as arcelinas (OSBORN et al., 1988), entre LLP e PHA desnaturada (CERIOTTI et al., 1989). Entretanto, não foi observado entre o IA e PHA (MORENO et al., 1990; HUESING et al., 1991). HUESING et al. (1991) e HARTWEEK et al. (1991) sugeriram que os genes responsáveis pela síntese dos inibidores, das lectinas e das arcelinas seriam diferentes, porém da mesma família.

2.3- EFEITOS DOS INIBIDORES DE ALFA AMILASE NO ORGANISMO

Os efeitos maléficos resultantes da ingestão dos IAs tem sido descritos na literatura, considerando diferentes aspectos. Um dos efeitos considerados seria o cariogênico. De acordo com UDUPA et al., 1989, os IAs poderiam favorecer a formação de cáries. Segundo esses autores, os polissacarídios, impedidos de serem hidrolisados pela α -amilase salivar, serviriam como uma matriz que envolveria as bactérias e resultaria na formação da placa. Através do metabolismo anaeróbio dos carboidratos, haveria a produção de ácido, favorecendo a desmineralização do dente e formação da cárie.

Outros efeitos podem ser gerados pelos IAs. GOMEZ et al., 1990 atribuem à família de IAs de trigo os alérgenos associados à asma de padeiro. Sugeriram que esse grupo de proteínas poderia ser um modelo adequado para o estudo de doenças alérgicas associadas à manipulação de farinhas de cereais. Também

BARBER et al., 1989, trabalhando com inibidor de amilase de cevada, atribuíram a essas proteínas a doença ocupacional alérgica desenvolvida por portadores de asma de padeiro, como consequência do trabalho com a manipulação de farinhas.

Apesar dos trabalhos descritos acima, a maioria das publicações trata dos efeitos nutricionais da ingestão desses compostos. Vários estudos descrevem efeitos no metabolismo de animais tratados com dieta contendo IAs. LAJOLO et al., 1984, demonstraram que um IA de feijão era resistente à digestão por proteases, capaz de reduzir o crescimento de ratos e a hiperglicemia, além de aumentar o metabolismo de ácidos graxos não esterificados do tecido adiposo. MARANESI et al. (1984), demonstraram que o inibidor de α -amilase de feijão provocava diminuição no crescimento de ratos, alterações no sangue e alterações histológicas nos órgãos internos dos animais (fígado e rins). Além disso, esse inibidor era capaz de provocar interferência na utilização do amido e a destruição dos depósitos de gordura. Também LANG et al., 1974, demonstraram que o IA de trigo provocava diminuição no crescimento de animais e interferência no metabolismo do amido. Estes resultados foram confirmados por KOTARU et al., 1991, que demonstraram que o inibidor marcado passava pelo intestino delgado de ratos, com pequena perda de antigenicidade e radioatividade.

Já NAGARAJ e PATTABIRAMAN, 1985, sugeriram a ausência de qualquer significado nutricional importante do IA de milho porque esse inibidor, embora ativo sobre α -amilase salivar e pancreática humana e pancreática de porco *in vitro*, era inativado

por enzimas proteolíticas. Também KUTTY e PATTABIRAMAN, 1986 isolaram um inibidor de amilase susceptível à inativação por enzimas proteolíticas.

2.4- INIBIDORES DE CEREAIS

Os IAs estão presentes em inúmeros vegetais, sendo que os mais estudados são os presentes em cereais e em leguminosas.

Entre os inibidores de cereais, os do trigo são os que acumulam mais informações. Os inibidores de trigo, que ocorrem em formas múltiplas são termoestáveis. KNEEN e SANDSTEDT (1946), descreveram um inibidor de α -amilase não afetado por aquecimento prolongado a 70°C. SHAINKIN e BIRK, 1970 verificaram que quando o inibidor AmI2 era fervido por 1 minuto ocorria somente 10-15% de perda de atividade enquanto o inibidor AmI1 foi estável ao aquecimento por 10 minutos. Além disso, o inibidor ativo pode ser detectado no interior de pães (KNEEN e SANDSTEDT, 1946).

O trigo apresenta no mínimo sete diferentes IAs divididos em pelo menos quatro famílias, com pesos moleculares de 12, 24, 44 e 60 kDa. São formados por cadeias polipeptídicas de pesos moleculares próximos a 12 kDa. Podem ser mono, di ou tetraméricos, sendo que os protômeros que formam os inibidores di e tetraméricos são unidos por ligações não covalentes e não são os mesmos, embora similares. As interações que formam a estrutura quaternária são específicas já que, ao se colocar um agente dissociante e retirá-lo, há reassociação das cadeias

polipeptídicas com recuperação da atividade inibidora. As subunidades possuem pontes dissulfídicas essenciais à atividade porque se forem tratadas com agentes redutores, a atividade é perdida irreversivelmente (BUONOCORE e SILANO, 1986).

Todas as famílias de inibidores do trigo possuem atividade sobre amilases de *Tenebrio molitor*, mas somente as diméricas e tetraméricas são ativas sobre amilases de mamíferos. As α -amilases de origem microbiana não sofrem ação dos inibidores de trigo, embora O'CONNOR e McGEENEY (1981) tivessem encontrado uma pequena atividade sobre as α -amilases de *B. subtilis* e *A. oryzae*. Os inibidores do trigo possuem pontos isoeletrônicos variáveis entre 4,2 e 7,1, mostrando que podem ser proteínas ácidas ou alcalinas. O teor de carboidratos é baixo (até 2,3%) ou mesmo nulo, o que demonstra que a interação com a α -amilase não ocorre pela porção carboidrática como sugeriram alguns pesquisadores.

Os IAs do trigo possuem susceptibilidades variáveis à ação de enzimas proteolíticas como a tripsina, quimotripsina, pepsina e pronase. É interessante observar que o tempo de pré incubação e as condições ótimas de pH e temperatura para a interação variam muito com a fração testada e também com a fonte de enzima. Com anticorpos produzidos contra IA de cada família foi possível reconhecer apenas os inibidores da mesma família. Esse fato, somado a grande homologia sequencial apresentada pelos IAs de uma mesma família confirma a similaridade entre seus membros e a adequação da classificação dessas famílias. Para alguns

inibidores do trigo, já se conhece a localização do gene no cromossomo (SANCHEZ-MONGE et al., 1989; GOMEZ et al., 1991).

Além do trigo, outros cereais contêm IAs. Entre eles, estão a cevada, o milheto, o centeio, o sorgo, o triticale e o arroz.

A cevada possui pelo menos 3 frações inibidoras, sendo que uma é bifuncional (amilase/subtilisina). Todas as frações tem pesos moleculares próximos a 20 kDa, e características semelhantes aos inibidores do trigo.

Já o milheto contém pelo menos 5 IAs, sendo que os pesos moleculares variam entre 10,7 e 19 kDa. As sequências primárias do I-2 (10,7 kDa) (CAMPOS e RICHARDSON, 1984) e do inibidor bifuncional (tripsina/amilase) (CAMPOS e RICHARDSON, 1983) foram determinadas e não demonstraram homologia. O I-2 é uma sequência polipeptídica de 95 aminoácidos e contém alto teor de serina e alanina, sendo susceptível à digestão por tripsina, quimotripsina, protease V8. O inibidor do milheto extraído por NAGARAJ E PATTABIRAMAN, 1985 era composto por duas subunidades (ambas essenciais à atividade) ligadas não covalentemente, o que difere do inibidor de α -amilase de centeio e milheto descritos anteriormente, que são unidos por pontes dissulfídicas.

O centeio também possui um inibidor de α -amilase. A proteína, que apresenta ponto isoelétrico de 5,8, tem peso molecular em torno de 28000 kDa, sendo composta por duas subunidades de pesos moleculares de 14000 kDa.

O inibidor de α -amilase de sorgo, descrito por KUTTY e PATTABIRAMAN, 1986 apresentou peso molecular semelhante ao do

inibidor de α -amilase de trigo, e o comportamento resultante de modificação química semelhante ao do inibidor de α -amilase de trigo, milho e inhame. É composto de duas subunidades de 10 kDa, unidas por pontes dissulfídicas. Esse inibidor atua sobre amilases humanas, sendo inativado por pepsina, pronase, tripsina e alfa quimotripsina, com pH ótimo entre 4 e 5, e estável a pHs ácidos.

O arroz teve seus inibidores identificados bem recentemente. A dificuldade encontrava-se na detecção, por ser o arroz um cereal com alta atividade amilásica. No trabalho descrito por FENG et al. (1991), o arroz apresentou 13 frações inibidoras, separáveis por HPLC, com atividade sobre uma ou mais das amilases testadas. Esses inibidores mostraram-se estáveis ao aquecimento a 70°C. Dessas frações, 3 foram analisadas quanto a composição de aminoácidos, demonstrando perfis parecidos.

2.5- INIBIDORES DE ALFA AMILASE DO FEIJÃO

Entre os IAs extraídos de leguminosas, os do feijão (*Phaseolus vulgaris*) são os mais estudados. Não existe na literatura qualquer trabalho descrevendo a purificação de IA a partir de feijões que não sejam *Phaseolus vulgaris*. Entretanto, resultados conflitantes são apresentados, quando se referem à detecção da atividade inibitória (POWERS e WHITAKER, 1977A; REDDY e SALUNKE, 1980).

Os IAs do feijão comum são glicoproteínas contendo entre 7,5% (FRELS e RUPNOW, 1984) e 15,0% (PICK e WOBER, 1978) de

carboidratos. A porção glicídica, composta por manose, xilose, fucose e glucosamina, não se mostrou necessária para a inibição, exceto no caso do inibidor isolado por SMITANOND, 1991. Apresentam pesos moleculares variáveis entre 40kDa (HO, 1989) e 60 kDa (YIN et al., 1989) quando determinados por peneira molecular.

Os IAs do feijão são compostos por subunidades (entre 2-4) cujos pesos moleculares variam entre 11 e 20 kDa. A dissociação do inibidor isolado por LAJOLO e FINARDI FILHO (1985), mostrou-se reversível quando o tratamento era feito com guanidina, parcialmente reversível quando o tratamento era feito com uréia e irreversível quando feito com SDS.

Os pontos isoelétricos dessas proteínas variam entre 4,35 (LAJOLO e FINARDI FILHO, 1985) e 5,20 (PICK e WOBER, 1978), demonstrando sua natureza ácida. Os pHs e temperaturas ótimos para a interação com a α -amilase pancreática de porco resultaram em valores entre 4,5 e 5,5 e 37 e 40°C, respectivamente. A pH 6,9 formam complexo 1:1 com a mesma enzima (POWERS e WHITAKER, 1977; TANIZAKI e LAJOLO, 1985), exceto para o inibidor I-1 purificado por FRELS e RUPNOW (1985), que apresentou estequiometria 2:1. A inibição é do tipo não competitivo, e, a pH 6,9, obedece cinética de segunda ordem. As constantes de dissociação do complexo a pH 6,9 variam entre $3,5 \times 10^{-11} \text{M}$ (POWERS e WHITAKER, 1977a) e $4,4 \times 10^{-9} \text{M}$ (TANIZAKI e LAJOLO, 1985), sendo que um tempo de pré incubação variável entre 60 minutos e 12 horas mostrou-se necessário para que a inibição máxima fosse alcançada. Esta, mostrou-se mais rápida a pH 5,4 que a 6,9 (TANIZAKI e LAJOLO, 1985).

O complexo pode ser dissociado por altas concentrações de maltose, mas não pelo estabelecimento de condições desfavoráveis à complexação. A formação do complexo enzima-inibidor não é dependente da presença do cálcio, mas na sua ausência, a estabilidade da enzima é reduzida (WHITAKER et al., 1988). Já o cloreto mostrou-se necessário para a formação do complexo a pH 6,9 mas não a pH 5,4. Os grupos sulfidrílicos não são importantes para a formação do complexo, ao contrário do que acontece com as interações hidrofóbicas (WHITAKER et al., 1988). São proteínas que possuem especificidade para amilases de origem animal, sendo inativas sobre amilases de microrganismos e de plantas. Além destas características já descritas, a de composição de aminoácidos também se mostrou similar entre as diferentes frações. Embora possam ter diferentes resistências ao aquecimento, são completamente inativados pela fervura (KOTARU et al., 1987).

Pelos trabalhos já publicados, sabe-se que feijões podem conter duas frações inibidoras, que podem estar presentes na mesma ou em diferentes variedades (IGUTI e LAJOLO, 1991). Entre as propriedades diferentes que elas apresentam, a da resistência ao aquecimento parece ser das mais importantes, o que levou a classificação dos inibidores de feijão em termossensíveis e termorresistentes. Uma outra forma de classificação é baseada na ordem de eluição da coluna de cromatografia hidrofóbica, sendo que a eluída em primeiro lugar, portanto a menos hidrofóbica, corresponde ao inibidor I-1 enquanto que a outra corresponde ao inibidor I-2. O inibidor I-1 é a fração termossensível, e a fração I-2 é a fração termorresistente nas variedades contendo ambas

(FRELS e RUPNOW, 1985). A maioria dos inibidores já caracterizados corresponde à fração termorresistente, sendo que as informações referentes à mesma e também à fração termossensível são as das presentes nas variedades que contém ambas (MARSHALL e LAUDA, 1977; PICK e WOBER, 1978; LAJOLO e FINARDI FILHO, 1985).

Neste trabalho, foram selecionadas duas variedades de feijão que apresentam apenas uma fração inibidora: Argentino e Jalo. Os inibidores destas duas variedades foram caracterizados e foi feito também o acompanhamento da síntese destas proteínas durante o desenvolvimento dos grãos. Para efeito de comparação, este mesmo acompanhamento foi feito com os inibidores da variedade Rico 23.

3- OBJETIVOS

Os objetivos gerais foram os de caracterizar inibidores de α -amilase de feijão, quando presentes como fração única.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- 1- A partir das variedades Jalo e Argentino:
 - a) Caracterizar os inibidores purificados.
- 2- A partir das variedades Jalo, Argentino e Rico 23:
 - a) Acompanhar a síntese dos IAs durante o desenvolvimento dos grãos.
 - b) Através das características eletroforéticas e de hidrofobicidade, acompanhar eventuais alterações dos inibidores durante o desenvolvimento dos grãos.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- MATERIAIS

4.1.1- Matéria prima

Neste estudo foram utilizados feijões (*Phaseolus vulgaris*, L.), variedades Jalo, Argentino e Rico 23. Os feijões Jalo e Argentino foram obtidos no comércio local e utilizados tanto para a caracterização quanto para o acompanhamento da síntese dos inibidores. Já o Rico 23, obtido na Seção de Leguminosas do Instituto Agrônomo de Campinas (SP), foi utilizado somente para o acompanhamento da síntese dos inibidores durante seu desenvolvimento.

4.1.2- Enzima

A alfa-amilase pancreática de porco (APP) foi do tipo IA duas vezes cristalizada (Sigma).

4.1.3- Resinas

As resinas para cromatografias foram: Octyl Sepharose CL-4B e Phenyl Sepharose CL-4B (Sigma), DEAE-celulose (Whatman) e Sephadex G-100 (Pharmacia).

4.1.4- Outros materiais

Foram utilizados também outros materiais, tais como: amido (Merck), albumina sérica bovina (Sigma), boridreto de sódio

(Sigma), tubos de diálise (Inlab), e acrilamida e bis-acrilamida recristalizadas (BDH-Laboratory Reagents).

Os demais reagentes foram de grau analítico e de diversas procedências.

4.2- MÉTODOS:

O trabalho experimental pode ser dividido em duas partes. Enquanto a primeira envolve a caracterização dos inibidores purificados das variedades Jalo e Argentino, a segunda refere-se ao acompanhamento da síntese dos inibidores das variedades Jalo, Argentino e Rico 23. Alguns dos métodos utilizados foram comuns nas duas partes, enquanto outros foram utilizados apenas em uma das etapas.

4.2.1- Métodos utilizados nas duas partes do trabalho

4.2.1.1- Proteína

Em todos os procedimentos para a determinação da proteína solúvel, foi utilizado o método descrito por LOWRY et al. (1956), e o padrão utilizado foi a albumina sérica bovina.

4.2.1.2- Atividade amilásica:

Todas as determinações de atividade amilásica foram feitas pelo método descrito por BERNFELD (1955) como segue: o amido solúvel, para se utilizado como substrato, foi reduzido com boridreto de sódio conforme recomendado por STRUMEYER (1967).

Neste procedimento, um volume de 0,10 ml de α -amilase foi acrescentado a um volume de 2,0 ml de tampão fosfato 0,05M, pH 6,9 contendo NaCl 38mM e CaCl₂ 0,1mM. Após a adição de 1ml de uma solução de amido 1%, preparado no mesmo tampão, a mistura foi incubada por 5 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 2 ml de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) 1% em meio alcalino. Após fervura por 5 minutos os tubos foram resfriados em água corrente. Em seguida, foram adicionados 5 ml de água destilada e as absorbâncias foram lidas a 540 nm. Para a determinação da atividade enzimática, foi definido que 1 UI (Unidade Internacional) de alfa-amilase corresponderia a liberação de 1 μ mol de maltose/minuto nas condições descritas.

4.2.1.3- Atividade inibidora da amilase

A atividade inibidora foi calculada com base na medida da atividade amilásica residual, após 45 minutos de pré incubação a 37°C na presença do inibidor, antes da adição do amido. 1 UIA (Unidade Inibidora da alfa-amilase) corresponde a inibição total de 10 UI de alfa-amilase.

4.2.2- Técnicas utilizadas na caracterização dos inibidores extraídos das variedades Jalo e Argentino.

4.2.2.1- Extração e purificação dos inibidores de α -amilase

A extração dos inibidores foi feita com água e a purificação, que incluiu basicamente as cromatografias em Octyl

Sepharose, DEAE-celulose e Sephadex G-100, foi feita de acordo com a técnica descrita por FINARDI FILHO (1990).

4.2.2.2- Eletroforese em meio alcalino

A eletroforese em meio alcalino (pH 8,3) foi feita em tubos de vidro, de acordo com a técnica descrita por DAVIS (1964).

4.2.2.3- Determinação do peso molecular

A determinação dos pesos moleculares foi feita pela técnica descrita por ANDREWS (1964). Neste procedimento, foi utilizada uma coluna contendo Sephadex G-100 equilibrada com tampão fosfato 0,05M, pH 6,9, contendo NaCl 0,15M. Os padrões utilizados foram: albumina sérica bovina (66 kDa), albumina de ovo (45 kDa), quimotripsinogênio A (25 kDa) e citocromo c (12,4 kDa). A determinação do V_0 foi feita pela aplicação de azul dextrano (2000 kDa) na coluna. A determinação dos pesos moleculares foi feita por estimativa a partir de uma curva padrão onde a ordenada foi representada pelo log (peso molecular) e a abcissa pelo volume de eluição das proteínas padrões.

4.2.2.4- Eletroforese em meio dissociante

A eletroforese em meio dissociante (2-mercapto etanol e SDS) foi feita de acordo com o método descrito por LAEMMLI (1970). A concentração dos géis foi de 12,5% de acrilamida. A fixação das proteínas foi feita com TCA 30% e a coloração, com Coomassie R 250.

4.2.2.5- Ponto isoelétrico

A determinação do ponto isoelétrico (pI) foi feita em tubos de vidro, de acordo com a técnica descrita por WRIGLEY (1971), utilizando anfólitos na faixa de 4-6. Os géis para revelação foram fixados com TCA 5%, lavados com água e corados com Coomassie G. Os demais foram cortados em cilindros de 2mm. A cada cilindro foi adicionado 1 ml de água destilada e o pH foi medido. Os cálculos dos pontos isoelétricos foram feitos por estimativa a partir de uma curva padrão, onde a ordenada foi representada pela distância ao catodo e a abcissa pelo pH.

4.2.2.6- Determinação dos açúcares

A presença de carboidratos nos inibidores foi verificada inicialmente pela técnica eletroforética (DAVIS, 1964), porém revelada para glicoproteínas, de acordo com o procedimento descrito por SCHIFF (19), utilizando fucsina. A quantificação da porção carboidrática foi feita pela técnica descrita por DUBOIS et al. (1956), utilizando a glicose como padrão.

4.2.2.7- Determinação do pH ótimo de interação entre a α -amilase e os inibidores

Inicialmente, os diferentes inibidores purificados foram incubados com APP em diferentes pHs por 45 minutos a 37°C. Após a correção do pH para 6,9, foi adicionado o substrato e determinada a atividade amilásica residual, conforme procedimento descrito em 4.2.1.2. Ao mesmo tempo foram feitos controles para observação de possíveis alterações na atividade amilásica pela ação dos tampões.

Foram utilizados os seguintes tampões, todos contendo NaCl 0,15M e CaCl_2 0,1mM: acetato (pH 4,5 a 5,5); fosfato de sódio (pH 6,5 a 7,5); tris-HCl (pH 7,5 a 9,5).

4.2.2.8- Determinação da temperatura ótima da interação enzima-inibidor

Os inibidores purificados foram incubados com APP em diferentes temperaturas por 45 minutos em pH 6,9. Após a correção da temperatura para 37°C, foi adicionado o substrato. A atividade amilásica foi determinada, conforme procedimento descrito no item 4.2.1.2. Ao mesmo tempo, foram feitos controles para observação de possíveis alterações na atividade enzimática resultantes da ação da temperatura.

4.2.2.9- Estabilidade do inibidor a diferentes temperaturas

Os inibidores purificados foram incubados em diferentes temperaturas (entre 5 e 55°C), em meios tamponados contendo NaCl 38mM e CaCl_2 0,1 mM. Após 24 horas, o meio foi equilibrado a temperatura de 37°C e pH 6,9. A seguir, foi adicionada a APP e, após 45 minutos de incubação, a atividade inibidora foi determinada conforme o item 4.2.1.3.

4.2.2.10- Estabilidade do inibidor a diferentes pHs

A observação da estabilidade dos inibidores purificados em diferentes pHs, foi feita por incubação dos mesmos por 24 horas em diferentes tampões (acetato, fosfato e tris-HCl), responsáveis pelos pHs entre 4,5 e 9,5. Em seguida, o pH foi corrigido para 6,9

e foi feita a adição da enzima. A mistura foi incubada por 45 minutos a 37°C e foi feita a medida da atividade inibidora conforme o item 4.2.1.3.

4.2.2.11- Composição de aminoácidos

A composição de aminoácidos foi feita em analisador automático Beckman, mod. 7300, após a hidrólise por HCl 6N a 100°C por 22 horas, de acordo com a técnica descrita por SPACKMAN et al., 1958.

4.2.2.12- Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

A determinação da temperatura de desnaturação térmica foi feita por DSC. O equipamento utilizado foi o Perkin-Elmer, mod. DSC-7, acoplado a uma unidade processadora 3700 Data Station, que utilizou o programa PETOS-DELTA. A determinação foi feita após a solubilização da amostra em água, sendo que a programação da velocidade de aquecimento foi feita para 10°C/min.

4.2.2.13- Estudos cinéticos da interação enzima-inibidor

Nos estudos cinéticos da interação enzima-inibidor, a quantificação da proteína contida na α -amilase pancreática de porco foi feita considerando $E_{280}^{1\%} = 24$ e peso molecular = 52kDa.

4.2.2.13.1- Estequiometria

A determinação da estequiometria da interação inibidor-enzima foi feita a pH 6,9, incubando-se $3,0 \times 10^{-9}$ M de enzima (APP) com concentrações variáveis entre 4,27 e $21,35 \times 10^{-9}$ M de

inibidor (variedade Argentino) e entre $4,78$ e $23,91 \times 10^{-9}M$ de inibidor (variedade Jalo) por 24 horas a $30^{\circ}C$, em 1 ml de tampão fosfato $0,04M$, contendo $CaCl_2$ $1mM$, $NaCl$ $0,05M$ e $0,3\%$ de albumina sérica bovina. Após esse período, a estequiometria foi estimada de acordo com a técnica descrita por TANIZAKI e LAJOLO (1985a).

4.2.2.13.2- Constante de dissociação

As constantes de dissociação foram determinadas a pH $6,9$, incubando $2,16 \times 10^{-9}M$ de enzima com os inibidores em concentrações variáveis entre $2,30$ e $11,50 \times 10^{-9}M$ (variedade Jalo) entre $2,14$ e $10,70 \times 10^{-9}M$ (variedade Argentino) em 1 ml de tampão fosfato $0,05M$, contendo $NaCl$ $0,02M$, $CaCl_2$ $1mM$ e $0,3\%$ de albumina sérica bovina a $30^{\circ}C$ por 24 horas. A seguir, foram determinadas as atividades enzimáticas residuais.

4.2.3- Técnicas utilizadas no acompanhamento dos IAs durante o desenvolvimento dos grãos das variedades Jalo, Argentino e Rico 23

4.2.3.1- Plantio, coleta e preparo das amostras:

Os grãos foram plantados em Jundiaí (SP) num terreno plano, observando-se distâncias mínimas de 5 cm entre cada pé, e de 20 cm entre cada fila. A coleta das amostras foi iniciada após a floração, sendo que, a cada amostragem, os pés foram arrancados. Os grãos foram separados das vagens, contados e pesados. Parte dos grãos foi utilizada para a determinação da umidade e do restante

foram preparados extratos para as análises posteriores. Os extratos foram preparados, homogeneizando-se os grãos com um tampão fosfato 0,05M, pH 6,9, contendo NaCl 0,15M. Após centrifugação, o sobrenadante foi utilizado para fracionamento com etanol entre 30 e 70% (v/v), sob refrigeração. O precipitado foi coletado por centrifugação, ressuspendido em solução de NaCl 0,15 M, dialisado e armazenado em freezer (-18°C) até uso.

4.2.3.2- Umidade

A determinação da umidade foi feita em estufa a 105°C e teve como objetivo o monitoramento da síntese da matéria seca total durante o desenvolvimento dos grãos.

4.2.3.3- Proteína

A determinação de proteína dos grãos foi feita pelo método de micro Kjeldahl, sendo que o fator utilizado foi 6,25.

4.2.3.4- Desglicosilação do inibidor

Para a determinação dos teores dos inibidores durante o desenvolvimento, foram utilizados anticorpos contra o inibidor desglicosidado, da variedade Argentino. A desglicosilação do inibidor foi feita de acordo com a técnica descrita por EDGE et al, 1981, como a seguir: 1 ml de anisol e 2 ml de TFMS (ácido trifluorometano sulfônico) foram misturados num tubo de ensaio com tampa de teflon com rosca e resfriados a 0°C; 5 mg de proteína foram solubilizados em 1 ml da mistura num tubo de Pierce e nitrogênio foi bombeado na solução por 30 segundos, seguido por

agitação magnética a 0°C em banho de gelo. A mistura foi diluída com éter dietílico previamente resfriada a -40°C. A solução foi adicionada uma solução de piridina 50%. O precipitado foi redissolvido por turbilhonamento e a fase etérea foi removida e descartada. Após repetição da extração, a porção aquosa foi dialisada contra 4 litros de tampão acetato-piridina 2mM, pH 5,5, e em seguida, contra água destilada. O inibidor desglicosilado foi armazenado em freezer a -18°C, após liofilização.

4.2.3.5- Preparo dos anticorpos

O preparo dos anticorpos foi feito utilizando o inibidor desglicosilado. Foi utilizado um coelho macho pesando aproximadamente 3 kg. O inibidor foi aplicado através de injeções subcutâneas. A primeira aplicação, contendo 500 microgramas de inibidor, foi feita com adjuvante completo de Freund's. A segunda aplicação foi feita após 14 dias e a terceira, após 28 dias, ambas com adjuvante incompleto de Freund's e 300 microgramas de IA em cada aplicação. Após 14 dias da terceira aplicação, foram coletados da orelha do animal, um volume de 30 ml de sangue.

Os anticorpos foram obtidos da seguinte maneira: após a coagulação do sangue, o soro foi separado e fracionado com sulfato de amônio. Após diálise do precipitado, o mesmo foi congelado em pequenos volumes, para usos posteriores. Para finalidade de controle, antes do início do experimento foi feita uma coleta de 10 ml de sangue.

4.2.3.6- Determinação do teor de inibidor por método imunológico

Inicialmente, foi traçada uma curva padrão da seguinte forma: quantidades conhecidas de inibidores purificados (entre 0 e 20 microgramas) das variedades Jalo e Argentino foram incubadas com os anticorpos produzidos contra o inibidor da variedade Argentino. A incubação foi feita em tampão tris-HCl 0,05M, pH 7,5, contendo NaCl 0,15M, por uma hora a 37°C. Após centrifugação, o sobrenadante teve o pH corrigido para 6,9 e foi adicionada a APP. A atividade inibidora residual foi determinada conforme item 4.2.1.3. Em seguida, foi traçada uma curva de absorbância a 540 nm vs massa de inibidor purificado. A quantificação do inibidor, foi feita por estimativa a partir da curva padrão, obedecendo-se o mesmo procedimento.

4.2.3.7- Purificação dos inibidores extraídos dos grãos em diferentes fases de desenvolvimento

Os extratos foram obtidos dos grãos das variedades Jalo, Argentino e Rico 23 conforme item 4.2.3.1. Em seguida, foram submetidos a cromatografias de interação hidrofóbica em colunas contendo Phenyl Sepharose, conforme técnica descrita por FRELS e RUPNOW, 1984.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A existência de duas frações inibidoras em feijões (I-1 e I-2) foi verificada somente após uso de processo de purificação que aboliu o aquecimento e introduziu a cromatografia hidrofóbica, capaz de separá-las (FRELS e RUPNOW, 1984). Em trabalho anterior, verificamos que enquanto algumas variedades de feijão possuíam as duas frações simultaneamente, outras possuíam apenas I-1 ou I-2. Verificamos ainda, que algumas frações possuíam características intermediárias, não se enquadrando perfeitamente em nenhum dos dois grupos (IGUTI e LAJOLO, 1991). Do feijão var. Rico 23, FINARDI FILHO (1990) obteve informações acerca das características dos dois IAs presentes concomitantemente nessa variedade. Nesse trabalho, descrevemos as características de inibidores presentes como fração única no grão.

5.1- Caracterização

5.1.1- Pesos moleculares

A determinação dos pesos moleculares foi feita por cromatografia em Sephadex G-100. A figura 1 mostra a curva de calibração obtida com padrões. Os pesos moleculares dos inibidores purificados dos feijões variedades Jalo e Argentino resultaram em valores de 50kDa e 48kDa, respectivamente e estão de acordo com os já obtidos para os inibidores extraídos de outras variedades. A tabela 1 mostra que os resultados apresentados em outros trabalhos variam entre 40 (HO, 1989) e 60 kDa (YIN et al., 1989), e o número de subunidades varia entre 2 e 4, com pesos moleculares entre 11 e 20 kDa.

Figura 1. Curva de calibração obtida da cromatografia em Sephadex G-100, para a obtenção dos pesos moleculares dos IAs purificados das variedades Jalo e Argentino.

Tabela 1- Comparação dos pesos moleculares dos inibidores e de suas subunidades (var. Jalo e Argentino), em relação aos de diferentes variedades de feijões.

Variedade de feijão	Tipo de IA	PESO MOLECULAR (kDa)		
		Filtração em Gel	subunidade (SDS-PAGE)	Nº de subunidades
Rico 23 (1)	I-1	58	17-20	2-3
	I-2	53	15-17,5	3
Black bean (2)	I-1	60	13-17,5	3-4
	I-2	49	13-17,5	3-4
Black kidney (3)	I-1	49	15,5-17 32-34	2
	I-2	47	15-17	3
Red kidney (4)		49	15-17	3-4
			12-15	
			11-12	
White kidney (5)		40	18-20	2
		42		
White (6)		43	11	3-4
			15,5	
Pinto bean (7)		45	-----	---
Jalo		50	----	3
Argentino		48	----	3

1- LAJOLO e FINARDI FILHO, 1985; FINARDI FILHO, 1990

2- YIN et al., 1990

3- FRELS e RUPNOW, 1984

4- POWERS e WHITAKER, 1977

5- HO, 1989

6- PICK e WOBER, 1978

7- KOTARU et al., 1987

5.1.2- Ponto isoelétrico

A curva de calibração obtida para a determinação dos pontos isoelétricos dos inibidores purificados das variedades Jalo e Argentino encontra-se na figura 2. Os pontos isoelétricos dos inibidores purificados de outras variedades de feijão variaram entre 4,35 (LAJOLO e FINARDI FILHO, 1983) e 5,20 (PICK e WOBER, 1978) (tabela 2), sendo que os obtidos para os inibidores das variedades Jalo e Argentino resultaram em 4,75 e 4,90, respectivamente. Todos os IAs purificados a partir de feijões apresentaram pIs inferiores a 7,0. Ao contrário que ocorre com os IAs de trigo, que podem ter caráter tanto ácido quanto alcalino, os de feijões apresentaram-se sempre ácidos. A pequena diferença entre os pIs dos diversos IAs purificados a partir de feijões indica que entre essas proteínas, o número total de resíduos ácidos e básicos não varia muito.

Figura 2. Curva de calibração obtida por focalização isoelétrica para determinação dos pontos isoelétricos.

5.1.3- Teor de carboidratos

A realização da eletroforese em meio alcalino, seguida por coloração com fucsina revelou a natureza glicoprotéica dos IAs purificados das var. Jalo e Argentino. Com o objetivo de se conhecer qual o teor da porção carboidrática dessas proteínas, foi aplicada a técnica para a determinação dos açúcares totais. Os teores de carboidratos totais resultaram em 9,6 e 7,6%, respectivamente para as variedades Jalo e Argentino. Pela tabela 2 verifica-se que os teores de carboidratos obtidos para os vários inibidores purificados pelos diversos pesquisadores que trabalham com feijão, variam entre 7,5% (FRELS e RUPNOW, 1984) e 15,0% (PICK e WOBER, 1978), sendo que nas variedades contendo dois inibidores, a fração 1, correspondente ao inibidor mais termossensível e menos hidrofóbico, possui teor de carboidratos mais baixo. Os teores de carboidratos apresentados pelos IAs purificados pela metodologia que envolve aquecimento (PICK e WOBER, 1978; MARSHAL e LAUDA, 1977) foram iguais ou superiores a 10%. Como o aquecimento a 70°C por 15 minutos inativa a fração termossensível, é provável que esses inibidores correspondam à fração termorresistente. A única exceção é referente ao IA purificado por POWERS e WHITAKER (1977), porque o aquecimento utilizou temperatura de 60°C e o teor de carboidratos situou-se num valor que poderia pertencer a qualquer um dos grupos, da mesma forma que ocorreu com o IA da variedade Jalo. O teor de carboidratos parece ser uma das características que sofre maiores variações quando se comparam os inibidores de alfa amilase extraídos de feijão. Pode-se supor que os

carboidratos estejam envolvidos nas diferenças de resistência ao aquecimento que os inibidores de feijão possuem.

Tabela 2- Teores de carboidratos e pontos isoelétricos dos IAs purificados de feijões (var Jalo e Argentino), e comparação com os de outros feijões.

Variedade		carboidratos (%)	pI
Rico 23 (1)	I-1	9,9	4,70-4,80
	I-2	12,1	4,65-4,80
Black kidney bean (2)	I-1	9,9	4,75
	I-2	10,2	4,65
Black kidney bean (3)	I-1	7,5	4,93
	I-2	9,0	4,86
Red kidney (4)		8,6	----
		13,0	
White (5)		11,0	5,00
White (6)		15,0	5,20
Pinto bean (7)		14,0	4,68
White kidney bean (8)		9-10	----
Jalo		9,6	4,75
Argentino		7,6	4,90

1- LAJOLO e FINARDI FILHO, 1985; FINARDI FILHO, 1990

2- YIN et al., 1990

3- FRELS e RUPNOW, 1984

4- POWERS e WHITAKER, 1977

5- HO, 1989

6- PICK e WOBER, 1978

7- KOTARU et al., 1987

8- MARSHALL e LAUDA, 1977

5.1.4- Estabilidade a temperatura e pH

As curvas de estabilidade dos dois IAs purificados aos diferentes pHs estão ilustradas na figura 3. Ambos inibidores mostraram-se mais estáveis a pHs mais baixos, ao redor de 4,5. Estes resultados não seriam previsíveis, já que o ponto mais estável está muito próximo ao pI de cada inibidor. Entretanto, o mesmo também foi observado com relação aos inibidores purificados por FRELS e RUPNOW (1985) (black kidney beans).

Figura 3. Estabilidade dos inibidores purificados de feijões var. Jalo e Argentino a diferentes pHs. Os IAs foram incubados a 15°C por 24 horas, em tampão acetato (pH 4,5-5,5), fosfato (pH 6,5-7,5) e tris-HCl (pH 8,5-9,5).

As estabilidades em diferentes temperaturas estão ilustradas na figura 4 e mostram que em temperaturas baixas (até 35°C) os inibidores são estáveis por 24 horas, mantendo sua atividade inicial. Nota-se que na temperatura de 45°C, há uma sensível perda da capacidade de inibição sobre a α -amilase, tornando-se nula a 55°C.

Figura 4. Estabilidade dos inibidores purificados de feijões (var Jalo e Argentino) a diferentes temperaturas. Os IAs foram incubados a pH 6,9 por 24 horas, antes da medida da atividade inibidora residual.

5.1.5- Condições ótimas de temperatura e pH para interação enzima-inibidor purificado

Os pHs ótimos de interação entre a APP e ambos inibidores purificados resultaram em 5,0 (figuras 5 e 6), que difere ligeiramente do pH ótimo obtido do inibidor I-2 da variedade Rico 23 (pH 5,4). Os resultados obtidos por outros pesquisadores (tabela 3) demonstraram variações de pHs entre 4,5 (FRELS e RUPNOW, 1984) e 5,5 (FRELS e RUPNOW, 1984; MARSHALL e LAUDA, 1975; PICK e WOBER, 1978).

Figura 5. pHs ótimos de interação entre APP e IAs purificados de feijão (var. Jalo). O IA foi incubado por 45 min. em tampão acetato (pH 4,0-5,5), fosfato (pH 6,0-7,0) e tris (7,5-8,0). Após correção do pH para 6,9, a atividade foi medida.

Figura 6. pHs ótimos de interação entre APP e IAs purificados de feijão (var. Argentino). O IA foi incubado por 45 min. em tampão acetato (pH 4,0-5,5), fosfato (pH 6,0-7,0) e tris (7,5-8,0). Após correção do pH para 6,9, a atividade foi medida.

As temperaturas ótimas resultaram em valores de 40°C para ambos os inibidores e encontram-se na figura 7. São idênticas para todos os inibidores de feijão (tabela 3) e reforçam a idéia de similaridade destas proteínas. É interessante observar que, embora a diferença entre a inibição a 40 e 45°C tenha sido pequena, a 45°C a estabilidade do inibidor é reduzida (fig.4).

Figura 7. Temperatura ótima de interação entre a amilase pancreática de porco e os inibidores das variedades Jalo e Argentino. Os IAs foram incubados por 45 min. em diferentes temperaturas. Após correção para 37°C, a atividade foi medida.

Tabela 3- Condições ótimas de pH e temperatura para interação entre os IAs purificados (var. Jalo e Argentino) e a amilase pancreática de porco, em comparação com outros obtidos feijões.

Variedade		Temperatura (°C)	pH
Rico 23 (1)	I-1 I-2	45	-- 5,4
Black kidney bean (2)	I-1 I-2	40 40	4,5-5,0 5,0-5,5
Red Kidney bean (3)		--	5,0
White kidney bean (4)		--	5,5
White kidney bean (5)		37	5,5
Jalo		40	5,0
Argentino		40	5,0

- 1- LAJOLO e FINARDI FILHO, 1985; FINARDI FILHO, 1990
- 2- FRELS e RUPNOW, 1984
- 3- POWERS e WHITAKER, 1977
- 4- PICK e WOBER, 1978
- 5- MARSHALL e LAUDA, 1977

5.1.6- Composição de aminoácidos

As composições aminoacídicas dos inibidores purificados dos feijões variedades Jalo e Argentino estão apresentadas na tabela 4. Esta tabela mostra ainda as composições dos inibidores de outras variedades de feijão. Comparando-se esses resultados, verifica-se que as composições em aminoácidos apresentaram-se similares, demonstrando que são proteínas caracterizadas pelos baixos ou nenhum teor de cisteína (0-4 resíduos/molécula) e metionina (0-6 resíduos/molécula). Além disso, apresentaram altos teores de ácido aspártico+asparagina (56-73 resíduos/molécula), serina (46-64 resíduos/molécula), valina (34-41 resíduos/molécula), ácido glutâmico+glutamina (30-44 resíduos/molécula) e treonina (30-37 resíduos/molécula). Deve-se mencionar ainda, que os valores apresentados na tabela 4 são resultantes do cálculo, considerando pesos moleculares de 50kDa para todas as proteínas.

Tabela 4- Comparação entre as composições de aminoácidos dos inibidores de feijão (em nº de resíduos/molécula).

VARIEDADES												
AA	Arg.	Jalo	Rico 23		Black kidney bean		LLP		Red bean	White	Pinto	
			I-1	I-2	I-1	I-2	I-1	I-2		Wilcox	Ho	
			Yin		Yin		Frels					
ASPX	68	66	54	73	60	69	56	64	65	62	63	67
THR	37	36	35	30	35	37	30	31	32	33	30	34
SER	61	56	52	49	51	55	46	49	59	53	64	54
GLX	35	34	44	34	33	33	34	36	30	35	35	29
PRD	10	10	14	12	14	9	14	12	9	11	12	9
GLY	21	22	27	19	25	20	29	25	16	21	18	18
ALA	26	25	24	22	27	23	27	26	20	25	14	22
CYS	0	0	-	1	0	0	2	1	0	4	0	0
VAL	41	40	38	34	34	35	34	34	38	35	45	38
MET	5	5	-	3	3	0	5	6	4	4	3	3
ISO	21	22	21	17	18	19	17	19	25	17	15	17
LEU	23	23	24	19	25	24	25	25	23	17	21	19
TYR	16	16	14	15	15	8	13	12	14	12	9	14
PHE	24	24	25	22	24	25	22	21	21	19	20	21
HIS	7	7	8	2	7	6	14	7	5	6	10	5
LYS	18	18	21	14	19	18	23	19	18	20	14	18
ARG	10	9	12	12	13	15	18	15	13	13	9	11
TRP	-	-	-	2	-	-	-	-	7	-	11	-

5.1.7- Análises térmicas (DSC)

Os termogramas de DSC foram obtidos pelo aquecimento das amostras de proteína purificada em água, a uma velocidade de 10°C/min. O inibidor da variedade Jalo apresentou o pico de desnaturação térmica a 88,3°C e o da variedade Argentino, a 86,4°C. Esses valores não devem ser considerados isoladamente, mas sempre junto com as condições experimentais. Esse cuidado se deve às grandes variações possíveis nos resultados quando se varia as condições experimentais, tais como proporção entre proteína e solução e velocidade de aquecimento. Esses resultados apresentaram-se superiores aos de perda de atividade (70°C) e isso se deve principalmente ao fato de que as concentrações protéicas foram diferentes nos ensaios de perda de atividade e de desnaturação térmica. A maior resistência ao aquecimento que o inibidor do Jalo apresenta já havia sido detectada anteriormente, tanto no ensaio de estabilidade ao aquecimento (figura 4), quanto nos ensaios de perda de atividade a 70°C.

5.1.8- Cinética de inibição

5.1.8.1- Estequiometria

Os resultados dos ensaios para a determinação da estequiometria da reação de inibição estão apresentados nas figuras 8 e 9. Estes resultados revelaram que a proporção enzima-inibidor na formação do complexo a pH 6,9, ocorreu na razão 1:1, para ambos inibidores purificados, e estão de acordo com os já obtidos anteriormente com inibidores extraídos de outras variedades de feijão.

Figura 8. Estequiometria da interação entre a amilase pancreática de porco e o IA da variedade Argentino, a pH 6,9. $3,0 \times 10^{-8} \text{ M}$ de enzima foram incubados com o inibidor em concentrações variáveis entre 4,27 e $21,35 \times 10^{-9} \text{ M}$ por 24 horas a 30°C , a pH 6,9. O intercepto no eixo das abscissas correspondeu à concentração de inibidor capaz de complexar toda a enzima presente no meio.

Figura 9. Estequiometria da interação entre a amilase pancreática de porco e o IA da variedade Jalo, a pH 6,9. $3,0 \times 10^{-9} \text{ M}$ de enzima foram incubados com o inibidor em concentrações variáveis entre 4,78 e $23,91 \times 10^{-9} \text{ M}$ por 24 horas a 30°C , a pH 6,9. O intercepto no eixo das abcissas correspondeu à concentração de inibidor capaz de complexar toda a enzima presente no meio.

5.1.8.2- Constante de dissociação

As constantes de dissociação (K_d) do complexo APP-inibidor, a pH 6,9 foram calculadas graficamente (BIETH, 1974), a partir dos resultados apresentados nas figuras 10 e 11. Os resultados obtidos mostraram uma K_d de $7,67 \times 10^{-9}M$ para o IA da variedade Argentino e de $8,31 \times 10^{-9}M$ para o IA da variedade Jalo. O I-2 da variedade Rico 23 apresentou, no mesmo pH, uma K_d de $4,4 \times 10^{-9}M$ (TANIZAKI e LAJOLO, 1985). Já o IA purificado por POWERS e WHITAKER (1977), apresentou uma K_d equivalente a $3,5 \times 10^{-11}M$.

Figura 10. Constante de dissociação do complexo enzima-inibidor da variedade Jalo. A amilase ($2,16 \times 10^{-9} M$) foi incubada com o inibidor em concentrações variáveis entre $2,30$ e $11,50 \times 10^{-9} M$ por 24 horas, a $30^\circ C$, em tampão fosfato pH 6,9. I_0 =concentração inicial do inibidor. a =enzima livre.

Figura 11. Constante de dissociação do complexo enzima-inibidor da variedade Argentino. A amilase ($2,16 \times 10^{-9} \text{M}$) foi incubada com o inibidor em concentrações variáveis entre $2,14$ e $10,70 \times 10^{-9} \text{M}$ por 24 horas, a 30°C , em tampão fosfato pH 6,9. I_0 =concentração inicial do inibidor. a =enzima livre.

5.2- Acompanhamento da síntese dos IAs durante o desenvolvimento dos grãos

Nessa segunda fase do trabalho, foram utilizadas as variedades Jalo, Argentino e Rico 23. Esta última foi selecionada por possuir duas frações ativas, já que era de nosso interesse verificar o comportamento das duas frações durante a síntese dos mesmos.

O acompanhamento da síntese dos IAs durante o desenvolvimento dos grãos foi feito de duas formas. A primeira, teve como objetivo a quantificação dos inibidores durante esse processo e para isso foi escolhida a técnica imunológica, pela especificidade dos anticorpos. A segunda, que teve como objetivo verificar características dessas proteínas durante esse processo, foi feita através de cromatografia hidrofóbica em Phenyl Sepharose.

Além do acompanhamento da síntese dos inibidores, foi feito também o acompanhamento da síntese de matéria seca total, massa dos grãos e proteína total. Estes dados adicionais serviram como parâmetros do processo de desenvolvimento dos grãos como um todo.

5.2.1- Massa total e umidade

As variações das relações entre as massas/grão e umidades, em função do desenvolvimento dos feijões das variedades Jalo, Argentino e Rico 23 estão apresentadas nas figuras 12, 13 e 14. Por elas verifica-se a similaridade na queda de umidade e no

aumento da massa durante o desenvolvimento das três variedades. O mesmo também foi observado em outras variedades. OLIKER et al., 1978, demonstraram que o peso máximo que os grãos atingem pode variar entre 32 e 42 dias após a floração, sendo que as diferenças se devem às condições ambientais de cultivo. As diferenças nas massas dos grãos da variedade Rico 23, quando comparadas com as outras duas é resultante das características agronômicas das plantas, e não refletem qualquer diferença nos tratamentos dispensados durante o cultivo. Houve um aumento gradativo na massa total dos grãos, provavelmente correspondentes à deposição de carboidratos e proteínas. Após um valor máximo, houve um decréscimo na relação massa/grão, correspondente à perda de umidade do grão. Nesta última fase, a queda no teor de umidade foi de 40% em 15 dias. Esses perfis similares estão de acordo com os resultados obtidos por ROBITAILLE (1978), que demonstrou que o padrão de acúmulo de matéria seca independe das características botânicas das variedades de feijões.

Figura 12. Massa total e umidade durante o desenvolvimento dos grãos da variedade Jalo.

Figura 13. Massa total e umidade durante o desenvolvimento dos grãos da variedade Argentino.

RICO 23

Figura 14. Massa total e umidade durante o desenvolvimento dos grãos da variedade Rico 23.

5.2.2- Massa seca, proteína e atividade

As figuras 15, 16 e 17 apresentam os teores de massa seca, proteína e atividade inibidora total por grão das variedades Jalo, Argentino e Rico 23, durante o desenvolvimento dos grãos. Observa-se que os valores aumentam rapidamente até 35 dias após a floração, aproximadamente. O crescimento máximo correspondeu ao período entre 20 e 35 dias após a floração. Este mesmo perfil pode ser observado para o aumento na atividade inibidora. Estes resultados indicaram que os inibidores foram sintetizados paralelamente às proteínas de reserva dos grãos. De acordo com SUN et al., 1978, entre o 16º e o 31º dia após a floração, o teor da principal proteína de reserva do feijão, a globulina G1, aumenta em 41 vezes. Segundo MORENO et al. (1990), as proteínas de reserva, as lectinas e os inibidores de alfa amilase são sintetizados num processo paralelo. De acordo com esses autores, os mecanismos seriam similares e envolveriam a síntese no retículo endoplasmático rugoso, modificação no aparelho de Golgi e depósito nos corpos protéicos.

Figura 15. Massa seca, proteína total e atividade total durante o desenvolvimento dos grãos da variedade Jalo.

Figura 16. Massa seca, proteína total e atividade total durante o desenvolvimento dos grãos da variedade Argentino.

RICO 23

Figura 17. Massa seca, proteína total e atividade total durante o desenvolvimento dos grãos da variedade Rico 23.

As figuras 18 e 19 apresentam as variações nas atividades específicas dos inibidores de alfa amilase de feijão (var. Argentino e Jalo), após extração em tampão fosfato 0,05M, pH 6,9, contendo NaCl 0,15M. As atividades específicas máximas corresponderam ao 26º e 30º dia após a floração (variedades Jalo e Argentino, respectivamente). Os resultados foram similares aos obtidos por PAREDEZ-LOPEZ et al., (1990), que acompanharam a síntese de lectina durante o desenvolvimento de feijão e verificaram que o teor máximo de lectina por 100g de proteína solúvel em tampão fosfato ocorreu aos 28 dias após a floração. Este comportamento deve ser resultante do acúmulo das proteínas solúveis nessa fase do processo de desenvolvimento.

Figura 18. Variações nas atividades específicas dos inibidores extraídos em tampão fosfato 0,05M, pH 6,9 contendo NaCl 0,15M, durante o desenvolvimento dos grãos de feijão (var. Jalo).

Figura 19. Variações nas atividades específicas dos inibidores extraídos em tampão fosfato 0,05M, pH 6,9 contendo NaCl 0,15M, durante o desenvolvimento dos grãos de feijão (var. Argentino).

5.2.3- Massa de inibidor

As figuras 20 e 21 apresentam as variações nos conteúdos dos inibidores durante o desenvolvimento dos feijões das variedades Jalo e Argentino, respectivamente.

Observa-se que o período correspondente à velocidade máxima de deposição de inibidor ocorreu entre 25 e 35 dias após a floração, aproximadamente. Esse período foi coincidente com o de síntese máxima das outras proteínas, e reforça a hipótese de que os IAs seriam sintetizados ao mesmo tempo que as proteínas de reserva.

Após um máximo, houve um pequeno decréscimo nos teores dos inibidores. Este mesmo comportamento foi observado por Moreno et al (1990), através de técnicas eletroforéticas, imunoblotting e de atividade. Os resultados obtidos por esses autores indicaram que o IA seria sintetizado como um precursor de peso molecular próximo a 35 kDa. Essa proteína sofreria um processo hidrolítico resultando em polipeptídios de pesos moleculares entre 15 e 18 kDa, antes do acúmulo nos corpos protéicos. Esse processo é muito semelhante ao descrito por CERIOTTI et al., 1989, que trabalhou com síntese *in vitro* de uma proteína denominada LLP. Essa proteína também seria composta por polipeptídios de pesos moleculares entre 15 e 20 kDa, resultante da fragmentação proteolítica de uma proteína. Os anticorpos produzidos por esses pesquisadores contra essa "pré proteína" foram capazes de reconhecer seus produtos de hidrólise. No nosso caso, não foi possível verificar a existência

dessa proteína antes da fragmentação, porque a mesma não apresenta atividade inibidora.

O ensaio de quantificação dos inibidores utilizando anticorpos, não foi realizado para a variedade Rico 23. Esta variedade possui duas frações inibidoras, e os anticorpos produzidos contra o inibidor da variedade Argentino reconheceu ambas frações, mas a diferentes intensidades. Este fato tornou impossível a determinação quantitativa dos inibidores desta variedade, pela utilização da mesma técnica.

Vale a pena mencionar que o reconhecimento implica na identidade imunológica entre estes inibidores. Ao mesmo tempo, o fato das intensidades serem diferentes significa também, que há diferenças estruturais entre estas proteínas.

Figura 20. Massa de inibidor durante o desenvolvimento dos grãos da variedade Argentino. A quantificação do inibidor foi feita por estimativa a partir de uma curva padrão. Esta, foi obtida pela ação dos anticorpos na atividade de quantidades conhecidas de inibidor.

Figura 21. Massa de inibidor dos grãos da variedade Jalo durante o desenvolvimento. A quantificação do inibidor foi feita por estimativa a partir de uma curva padrão. Esta, foi obtida pela ação dos anticorpos na atividade de quantidades conhecidas de inibidor.

5.2.4- Purificação dos inibidores em diferentes fases do desenvolvimento

As figuras seguintes apresentam os perfis de eluição de colunas de Phenyl Sepharose, dos inibidores extraídos de feijões, variedades Argentino (fig. 22 e 23), Jalo (fig. 24 e 25) e Rico 23 (fig. 26 e 27), respectivamente, em diferentes fases do desenvolvimento. Pode-se observar que enquanto os perfis de eluição dos inibidores foram similares, das outras proteínas variou consideravelmente. Para a variedade Argentino e Rico 23, as atividades específicas aparentes (considerando a A₂₈₀) foram maiores em grãos maduros, enquanto que no caso do Jalo, não houve alteração. As proteínas purificadas apresentaram natureza glicoprotéica (eletroforese reveladas para glicoproteínas) com as mesmas mobilidades eletroforéticas dos inibidores purificados de grãos maduros. Estes resultados mais o fato de que a hidrofobicidade não se alterou durante o desenvolvimento, indicaram que o processo de síntese dos IAs se completa de forma contínua e que não houve grandes diferenças nas características dessas proteínas durante o desenvolvimento dos grãos. Além disso, reforçam a idéia de que a síntese dos inibidores ocorre num processo paralelo à síntese das proteínas de reserva.

Além disso, a não diferença no processo de síntese dos dois inibidores da variedade Rico 23 não auxiliou na obtenção de informações acerca da razão da existência de duas frações inibidoras em algumas variedades. É provável que seja resultante de processo evolutivo, onde cruzamentos de variedades contendo uma

ou outra proteína podem ter resultado em variedades contendo ambas, ou em proteínas com características intermediárias entre as duas. Há ainda a possibilidade de ter ocorrido o inverso, ou seja, variedades contendo ambas proteínas podem ter dado origem a novas variedades contendo apenas uma das duas.

17 DAF

Figura 22. Purificação do inibidor extraído de grãos da variedade Argentino, colhidos 17 dias após a floração.

Figura 23. Purificação do inibidor extraído de grãos da variedade Argentino, colhidos 48 dias após a floração.

19 DAF

Figura 24. Purificação do inibidor extraído de grãos da variedade Jalo, colhidos 19 dias após a floração.

50 DAF

Figura 25. Purificação do inibidor extraído de grãos da variedade Jalo, colhidos 50 dias após a floração.

Amostra 2

Figura 26. Purificação do inibidor extraído de grãos da variedade Rico 23, colhidos início do desenvolvimento.

Amostra 4

Figura 27. Purificação do inibidor extraído de grãos da variedade Rico 23, colhidos no final do desenvolvimento

6- CONCLUSOES:

1- Os resultados de peso molecular, ponto isoelétrico, composição de aminoácidos, valores de pH e temperatura ótimos e de cinética de inibição com alfa amilase pancreática de porco indicaram que os inibidores de feijões (variedades Jalo e Argentino) possuem características estruturais semelhantes às dos demais inibidores de feijões já purificados e caracterizados. Estes parâmetros não permitem a diferenciação entre os IAs termossensíveis e termorresistentes.

2- Pelo teor de carboidratos, calorimetria diferencial exploratória e por ensaios imunológicos, podem ser demonstradas diferenças estruturais entre os dois inibidores.

3- Os inibidores de alfa amilase de feijões são proteínas cuja síntese é iniciada em torno do vigésimo dia após a floração. A velocidade máxima de deposição dessas proteínas correspondeu ao período entre 25 e 35 dias após a floração e o processo ocorre simultaneamente à síntese das proteínas de reserva do grão.

4- As cromatografias em Phenyl Sepharose e as eletroforeses dos inibidores em diferentes fases do desenvolvimento dos grãos indicaram que não há grandes diferenças nas características dessas proteínas durante esse processo.

7- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALTABELLA, T, CHRISPEELS, M.J. Tobacco plantas transformed with the bean ai gene express an inhibitor of insect amylase in their seeds. *Plant Physiol.*, Massachussets, v.93, p.805-810, 1990.
- ANDREWS, P. Estimation of the molecular weights of proteins by sephadex gel filtration. *Biochem. J.*, London, v.91, p.222-233, 1964.
- ANTHONY, J.L., VONDER HAAR, R.A., HALL, T.T. Nucleotide sequence of a genomic clone encoding arcelin, a lectin like seed protein from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.*, Massachussets, v.97, p.839-840, 1991.
- BAKER, J.E. Interaction of inhibitor 0.12 from wheat with two amylase isozymes from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (coleoptera: curculionidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, Oxford, v.92B, n.2, p.389-393, 1989.
- BAKER, J.E. Purification of an alpha-amylase inhibitor from wheat, *T. aestivum*, and its interaction with amylases from the rice weevil, *S. oryzae* (coleoptera: curculionidae). *Insect Biochem.*, London, v.18, n.1, p.107-116, 1988.
- BARBER. D., SANCHEZ-MONGE, R., GOMEZ, L., CARPIZO, J., ARMENTIA, A., LOPEZ-OTIN, C., JUAN, F., SALCEDO, G. A barley flour inhibitor of insect alpha amylase is a major allergen associated with baker's asthma disease. *FEBS Let.*, Amsterdam, v.248, n.1-2, p.119-122, 1989.
- BERNFELD, P. Amylases alpha and beta. *Meth. Enzymol.*, New York, v.1, p.149-154, 1955.

- BERNHARD, W., SOMERVILLE, C.R. Coindentity of putative amylase inhibitors from barley and finger millet with phospholipid transfer proteins enferred from aminoacid sequence homology. *Arch. Biochem. Biophys.*, Washington, v.269, n.2, p.695-697, 1989.
- BIETH, J. Some kinetic consequences of the tight binding of protein-proteinase inhibitors to proteolytic enzymes and their application to the determination of dissociation constants. *Bayer Symposium V "Proteinase inhibitors"*, by Springer Verlag, Berlim, New York, 1974, pp. 463-469.
- BLANCO-LABRA, A., ITURBE-CHINAS, F.A. Purification and characterization of an alpha-amylase inhibitor from maise (*Zea maize*). *J. Food Biochem.*, Westport, v.5, n.1, p.1-17, 1981.
- BOWMAN, D.E. Amylase inhibitor of navy beans *Science*, Washington, v.102, n.2649, 1945.
- BUONOCORE, V., DE BIASI, M.G.; GIARDINA, P.; POERIO, E., SILANO, V. Purification and properties of an alpha amylase tetrameric inhibitor from wheat kernel. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.831, p.40-48, 1985.
- BUONOCORE, V., SILANO, V. Biochemical, nutritional and toxicological aspects of alpha-amylase inhibitors from plant foods. *Adv. Exper. Med. Biol.*, New York, v.199, p.483-507, 1986.
- CAMPOS, F.A.P., RICHARDSON, M. The complete amino acid sequence of the bifunctional alpha-amylase/trypsin inhibitor from seeds of ragi (Indian finger millet, *Eleusine coracana* Gaertn.). *Febs Lett.*, Amsterdam, v.152, n.2, p., 1983.

- CAMPOS, F.A.P., RICHARDSON, M. The complete amino acid sequence of the alpha-amylase inhibitor I-2 from seeds of ragi (Indian finger millet, *Eleusine coracana* Gaertn) *Febs Lett.*, Amsterdam, v.167, n.2, p.221-225, 1984.
- CERIOTTI, A., VITALE, A., BOLLINI, R. Lectin-like proteins accumulate as fragmentation products in bean seed protein bodies. *Febs Lett.*, Amsterdam, v.250, p.157-160, 1989.
- CHRSZASZCZ, T e JANICKI, J. *Biochem. Z.* v.28, p.296, 1934.
- CHRISPEELS, M.J. The golgi apparatus mediates the transport of phytohemagglutinin to the protein bodies in bean cotyledons. *Planta*, v.158, p.140-151, 1983.
- DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, N.York, v.121, p.404-427, 1964.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, v.28, n.3, p.350-356, 1956.
- EDGE, A.S.B., FALTYNEK, C.R., HOF, L., REICHERT, L.E., WEBER, P. Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid. *Anal. Biochem.*, New York, v.118, p.131-137, 1981.
- FENG, G.-H.; CHEN, M.; KRAMER, K.J.; REECK, G.R. Alpha amylase inhibitors from rice: fractionation and selectivity toward insect, mammalian, and bacterial alpha amylases. *Cereal Chem.*, St. Paul, v.68, n.5, p.516-521, 1991.
- FINARDI FILHO, F. Estrutura molecular comparativa dos isoainibidores de alfa amilase do feijão (*Phaseolus vulgaris*). São Paulo, 1990 /Tese de doutorado-FCF-USP/.

- FINARDI FILHO, F. e LAJOLO, F.M. Identificação eletroforética de inibidor de alfa amilase em géis de poliacrilamida-amilopectina. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v.2, n.1, p.21-32, 1982.
- FOSSUM, K. e WHITAKER, J.R. Simple method for detecting amylase inhibitors in biological materials. *J. Nutr.*, Philadelphia, v.104, p.930-936, 1974.
- FRELS, J.M., RUPNOW, J.H. Purification and partial characterization of two alpha-amylase inhibitors from black bean *Phaseolus vulgaris*. *J. Food Biochem.*, Westport, v.8, p. 281-301, 1984.
- FRELS, J.M., RUPNOW, J.H. Characterization of two alpha-amylase inhibitors from black bean *Phaseolus vulgaris*. *J. Food Science.*, Chicago, v.50, p. 72-77, 105, 1985.
- GATEHOUSE, A.M.R., FENTON, K.A., JEPSON, I., PAVEY, D.J. The effects of alpha-amylase inhibitors on insect storage pests:inhibition of alpha amylase *in vitro* and effects on development *in vivo*. *J. Sci. Food Agric.*, London, v.37, p.727-734, 1986.
- GOMEZ, L., MARTIN, E., HERNANDEZ, D., SANCHEZ-MONGE, R., BARBER, D., DEL POZO, V., ANDRES, B., ARMENTIA, A., LAHOZ, C., SALCEDO, G., PALOMINO, P. Members of the alpha amylase inhibitors family from wheat endosperm are major allergens associated with baker's asthma. *Febs Lett.*, Amsterdam, v.261, n.1, p.85-88, 1990.
- GOMEZ, L., SANCHEZ-MONGE, R., LOPEZ-OTIN, C., SALCEDO, G., Wheat inhibitors of heterologous alpha amylases. *Plant Physiol.*, Massachussets, v.96, p.768-774, 1991.

- GRANUM, P.E. Purification and characterization of an alpha-amylase inhibitor from rye (*Secale cereale*) flour. *J. Food Biochem.*, Westport, v.2, p.103-120, 1978.
- HARTWECK, L.M., VOGELZANG, R.D., OSBORN, T.C. Characterization and comparison of arcelin seed protein variants from common bean. *Plant Physiol.*, Massachussets, v.97, p.204-211, 1991.
- HENRY, R.J., BATTERSHELL, V.G., BRENNAN, P.S., OONO, K. Control of wheat alpha amylase using inhibitors from cereals. *J. Sci. Food Agric.*, London, v.58, p.281-284, 1992.
- HUESING, J.E., SHADE, R.E., CHRISPEELS, M.J., MURDOCK, L.L. Alpha-Amylase inhibition, not phytohemagglutinin, explains resistance of common bean seeds to cowpea weevil. *Plant Physiol.*, Massachussets, v.96, p.993-996, 1991.
- IDA, E.I. Purificação e caracterização parcial dos inibidores de alfa amilase do triticales *Triticum x secale*. São Paulo, 84p., 1986 /Tese de doutorado-FCF-USP/
- IGUTI, A.M. e LAJOLO, F.M. Occurrence and purification of alpha amylase isoinhibitors in bean (*Phaseolus vulgaris*) varieties. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v.39, n.12, p. 2131-2137, 1991.
- IRSHAD, M. E SHARMA, C.B. Purification and properties of an alpha amylase protein-inhibitor from *Arachis hypogaea* seeds. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.659, p.326-333, 1981.
- KNEEN, E. e SANDSTEDT, R.M. Distribution and general properties of an alpha amylase inhibitor in cereals. *Arch. Amer. Chem. Soc.*, v.65, p.235-249, 1946.
- KOTARU, M., IWAMI, K., YEH, H.Y., IBUKI, F. Resistance of cranberry bean (*Phaseolus vulgaris*) alpha amylase inhibitor to

intraluminal digestion and its movement along rat gastrointestinal: further investigation using a radioactive probe and specific antiserum. *Food Chem.*, Barking, v.42, p.29-31, 1991.

KOTARU, M., SAITO, K., YOSHIKAWA, H., IKEUCHI, T., IBUKI, F. Purification and some properties of an alpha-amylase inhibitor from cranberry bean (*Phaseolus vulgaris*). *Agric Biol. Chem.*, v.51, p.577-578, 1987.

KUTTY, A.V., PATTABIRAMAN, T.N. Isolation and characterization of an amylase inhibitor from sorghum seeds, specific for human enzymes. *J. Sci. Food Agric.*, London, v.34, p.552-557, 1986.

LAJOLO, F.M., FINARDI FILHO, F. Partial characterization of the amylase inhibitor of black beans *Phaseolus vulgaris* variety Rico 23. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v.33, p.132-138, 1985.

LAJOLO, F.M., MANCINI FILHO, J., MENEZES, E.W. Effect of a beans *Phaseolus vulgaris* alpha amylase inhibitor on starch utilization *Nutr. Rep. Int.*, Los Altos, v.30, n.1, p.45-54, 1984.

LANG, J.A., CHANG-HUM, L.E., REYES, P.S., BUGGS, G.M. Interference of starch metabolism by alpha amylase inhibitors. *Fed. Proc.*, Maryland, v.33, p.718, 1974.

LAZARO, A., SANCHEZ-MONGE, R., SALCEDO, G., PAZ-ARES, J., CARBONERO, P., GARCIA-OLMEDO, F. A dimeric inhibitor on insect alpha-amylase from barley. Cloning of cDNA and identification of the protein. *Eur. J. Biochem.*, Liège, v.172, p.129-134, 1988.

LILLEY, G., INGLIS, A.S. Amino acid sequence of conglutin delta, a sulfur-rich seed protein of *Lupinus angustifolius* L. Sequence

- homology with the C-III alpha amylase inhibitor from wheat. *Febs Lett.*, Amsterdam, v.195, n.1-2, p., 1986.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.193, p.265-275, 1951.
- LYONS, A., RICHARDSON, M., TATHAM, A.S., SHEWRY, P.R. Characterization of homologous inhibitors of trypsin and alpha-amylase from seeds of rye (*Secale cereale* L.). *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.915, p.305-313, 1987.
- MARANESI, M., BARZANTI, V., BIAGI, P.L., CARENINI, G., GENTILI, P. Nutritional studies on anti-alpha amylase:II. lipid metabolism investigation:fatty acid composition of organs and tissues. *Acta Vitaminol. Enzymol.*v.6, n.4, p.347-354, 1984.
- MARSHALL, J.J., LAUDA, C.M. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of alpha amylase from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.25, p.8030-8037, 1975.
- MATOO, A.K., MODI, V.V. Partial purification and properties of enzyme inhibitors fromunripe mangoes. *Enzymologia*, Den Haag, v.39, p.237, 1970
- MENEZES, E.W., LAJOLO, F.M. Inhibition of starch digestion by a black bean alpha amylase inhibitor, in normal and diabetic rats. *Nutr. Rep. Int.*, Los Altos, v.336, p.1185-1195, 1987.
- MORENO, J., ALTABELLA, T., CHRISPEELS, M.J. Characterization of alpha amylase inhibitor, a lectin-like protein in the seeds of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.*, Massachussets, v.92, p.703-709, 1990.

- MORENO, J., CHRISPEELS, M.J. A lectin gene encodes the alpha amylase inhibitor of the common bean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.86, p.7885-7889, 1989.
- MUNDY, J., HEJGAARD, J., SVENDSEN, I. Characterization of a bifunctional wheat inhibitor of endogenous alpha-amylase and subtilisin. *Febs Lett.*, Amsterdam, v.167, n.2, p., 1984.
- NAGARAJ, R.H., PATTABIRAMAN, T.N. Isolation of an amylase inhibitor from *Setaria italica* grains by affinity chromatography on blue sepharose and its characterization. *J. Sci. Food Agric.*, London, v.33, p.646-650, 1985.
- O'CONNOR, C.M. e McGEENE;Y, K.F. Isolation and characterization of four inhibitors from wheat flour which display differential inhibition specificities for human salivary and human pancreatic alpha amylases. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.658, p.387-396, 1981.
- OLIKER, M., POLJAKOFF-MAYBER, P., MAYER, A.M. Changes in weight, nitrogen accumulation, respiration and photosynthesis during growth and development of seeds and pods of *Phaseolus vulgaris*. *Amer. J. Bot.* v.65, n.3, p.366-371, 1978.
- OSBORN, T.C., ALEXANDER, D.C., SUN, S.S.M., CARDONA, C., BLISS, F.A. Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. *Science*, Washington, v.240, p.207-210, 1988.
- PAL, G.P., BETZEL, C., JANY, K.-D., SAENGER, W. Crystallization of the bifunctional proteinase/amylase inhibitor PKI-3 and of its complex with proteinase K. *Febs Lett.*, Amsterdam, v.197, n.1-2, p., 1986.

- PAREDES-LOPEZ, O., GUEVARA-LARA, BARBA DE LA RONA, A.P. *Food Chem.*, Barking, v.35, p.237-242, 1990.
- PICK, K.-H., WOBER, G. Proteinaceous alpha amylase inhibitor from beans *Phaseolus vulgaris*., *Hoppe-seyler's Z. Physiol. Chem.*, Berlin, v.359, p.1371-1377, 1978a.
- PICK, K.H., WOBER, G. Proteinaceous alpha-amylase inhibitor from beans *Phaseolus vulgaris*. Immunological characterization. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, Berlin, v.359, p. 1379-84, 1978b.
- POWERS, J.R., WHITAKER, J.R. Effects of several experimental parameters on combination of red kidney bean *Phaseolus vulgaris* alpha amylase inhibitor with porcine pancreatic alpha amylase. *J. Food Biochem.*, Westport, v.1., p.239-260, 1977.
- POWERS, J.R., WHITAKER, J.R. Purification and some physical and chemical properties of red kidney bean *Phaseolus vulgaris* alpha amylase inhibitor. *J. Food Biochem.*, Westport, v.1., p.217-238, 1977.
- REDDY, N.R., SALUNKHE, D.K. Alpha-amylase inhibitor and phytohemagglutinins of black gram (*Phaseolus mungo* L). *J. Food Biochem.*, Westport, v.4, p.273-276, 1980.
- ROBITAILLE, H.A. Dry matter accumulation in indeterminate *Phaseolus vulgaris*, L. cultivars. *Crop Sci.*, v.18, 1978.
- ROMANELLI, P.F., LAJOLO, F.M., FINARDI FILHO, F. Inibidores de alfa amilase do triticales (*Triticum x Secale*): purificação parcial. *Rev. farm. Bioquim. Univ. S. Paulo*, São Paulo, v.24, n.11, p.50-61, 1988.

- SAMANT, S.K., REGE, D.V. Some enzymes and enzyme inhibitors from cucurbit seeds. *J. Sci. Food Agric.*, London, v.47, p.383-385, 1989.
- SANCHEZ-MONGE, R., GOMEZ, L., GARCIA-OLMEDO, F., SALCEDO, G. New dimeric inhibitor of heterologous alpha amylases encoded by a duplicated gene in the short arm of chromosome 3B of wheat (*Triticum aestivum* L). *Eur. J. Biochem.*, Amsterdam, v.183, p.37-40, 1989.
- SHAINKIN, R. e BIRK, Y. Alpha amylase inhibitors from wheat. Isolation and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* , Amsterdam, v.221, p.502-513, 1970.
- SHARMA, K.K., PATTABIRAMAN, T.N. Natural plant enzyme inhibitors. Purification and properties of an amylase inhibitor from yam (*Discorea alata*) *J. Sci. Food Agric.*, London, v.33, p.255-262, 1982.
- SHEWRRY, P.R., LAFIANDRA, D., SALCEDO, G., ARAGONCILLO, C., GARCIA-OLMEDO, F., LEW, E.J.-L., DIETLER, M.D., KASARDA, D.D. N-terminal amino acid sequences of chloroform/methanol soluble proteins and albumin from endosperms of wheat, barley and related species. Homology with inhibitors of alpha-amylase and trypsin and with 2S storage globulins. *Febs Lett.*, Amsterdam, v.175, n.2, p., 1984.
- SHIVARAJ, B., PATTABIRAMAN, T.N. Natural plant enzyme inhibitors. Characterization of an unusual alpha amylase/trypsin inhibitor from ragi (*Eleusine coracana* Gaertn) *Biochem. J.* , London, v.193, p.29-36, 1981.

- SHIVARAJ, B., RAO, N., PATTABIRAMAN, T.N. Natural plant enzyme inhibitors. Isolation of a trypsin/alpha amylase inhibitor and a chymotrypsin/trypsin inhibitor from ragi (*Eleusine coracana*) grains by affinity chromatography and study of their properties. *J. Sci. Food Agric.*, London, v.33, p.1080-1091, 1982.
- SMITANOND, B., BONGOTRAT, P., PITIYONT, V., OHSAWA, K., HONDA, H., YAMAMOTO, I. Characterization of the ecochemical in kidney beans which inhibits the larval growth of the azuki bean weevil. *Nippon Noyaku Gakkaishi*, v.16, n.2, p.179-188, 1991.
- STRUMEYER, D.H. A modified starch for use in amylase assays. *Anal. Biochem.*, New York, v.19, p.61-71, 1967.
- SUN, S.M., MUTSCHLER, M.A., BLISS, F.A., HALL, T.C. Protein synthesis and accumulation in bean cotyledons during growth. *Plant Physiol.*, Massachussets, v.61, p.918-923, 1978.
- SVENDSEN, I., HEJGAARD, J., MUNDY, J., Complete amino acid sequence of the alpha amylase/subtilisin inhibitor from barley. *Carlsberg Res. Commun.*, Amsterdam, v.51, p.43-50, 1986.
- SVENSSON, B., ASANO, K., HONASSEN, I., POULSEN, F.M., MUNDY, J., SVENDSEN, I. A 10 kD barley seed protein homologous with an alpha amylase inhibitor from indian finger millet. *Carlsberg Res. Commun.*, Amsterdam, v.51, p.493-500, 1986.
- TAJIRI, T, KOBAYASHI, Y., UEDA, S. Amylase inhibitors produced by *Streptomyces* sp. n^o 280. *Agric Biol. Chem.*, Tokio, v.47, p.671-679, 1983.
- TANIZAKI, M.M., LAJOLO, F.M. Kinetics of the interaction of pancreatic alpha-amylase with a kidney bean *Phaseolus vulgaris*

- alpha-amylase inhibitor. *J. Food Biochem.*, Westport, v.9, p. 71-89, 1985.
- TANIZAKI, M.M., LAJOLO, F.M., FINARDI FILHO, F. Combination of black bean *Phaseolus vulgaris* amylase inhibitor with modified pancreatic alpha amylase. *J. Food Biochem.*, Westport, v.9., p.91-104, 1985.
- TAUFEL, A., BEHNKE, U., EMMER, I., GABOR, R. Studies on the germination-specific alpha amylase and its inhibitor in rye. Part 2. Isolation and characterization of the inhibitor. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* v.193, n.1, p.9-14, 1991.
- UDUPA, B.L., PRABHAKAR, A.R., TANDON, S. Alpha amylase inhibitors in foodstuffs. *Food Chem.*, Barking, v.34, p.95-101, 1989.
- VAIDYANATHAN, V.V., VIRUPAKSHA, T.K. Multiple molecular forms of finger millet subtilisin and amylase inhibitors. *J. Food Sci.* Chicago, v.54, p.367-378, 1991.
- VITALE, A., CERIOTTI, A., BOLLINI, R., CHRISPPEELS, M.J. Biosynthesis and processing of phytohemagglutinin in developing bean cotyledons. *Eur. J. Biochem.*, Amsterdam, v.141, p.97-104, 1984.
- WHITAKER, J.R. Alpha-amylase inhibitors of higher plants and microorganisms. *79th Annual Meeting of the American Oil Chemists Society*, Phoenix, May 11, 1988.
- WHITAKER, J.R., FINARDI FILHO, F., LAJOLO, F.M. Parameters involved in binding of porcine pancreatic alpha amylase with black bean inhibitor: role of sulfhydryl groups, chloride, calcium solvent composition and temperature. *Biochimie*, v.70, p.1153-1161, 1988.

- WILCOX, E.R., WHITAKER, J.R. Structural features of red kidney bean alpha amylase inhibitor important in binding with alpha amylase. *J. Food Biochem.*, Westport, v.8., p.189-213, 1984.
- WRIGLEY, C.M. Gel eletrofocusing. *Meth. Enzymol.*, New York, v.22, p.559-564, 1971.
- YETTER, M.A., SAUNDERS, R.M., BOLES, J.P. Alpha-amylase inhibitors from wheat kernels as factors in resistance to post harvest insects. *Cereal Chem.*, St. Paul, v.56, n.4, p.243-244, 1979.
- YIN, X., HO, F.M., FINARDI FILHO, F., LAJOLO, F.M., WHITAKER, J.R. Structural and mechanistic aspects of common bean (*Phaseolus vulgaris*) alpha amylase inhibitors. *Proc. 1st Brazilian Congress on Proteins*, Campinas, March, 4-9, 1990 (Published 1991), UNICAMP Press.
- ZAWISTOWSKA, U., LANGSTAFF, J., FRIESEN, A.D. Purification and characterization of two double-headed triticales isoinhibitors of endogenous alpha-amylase and subtilisin. *J. Food Biochem.*, Westport, v.13, p.215-239, 1989.

8- RESUMO

Inibidores de alfa amilase de feijão (*Phaseolus vulgaris*) foram caracterizados. O inibidor da variedade Jalo apresentou peso molecular de 50kDa (por filtração em gel), ponto isoelétrico de 4,75 e 9,6% de carboidratos. O inibidor da variedade Argentino apresentou peso molecular de 48kDa, ponto isoelétrico de 4,90 e 7,6% de carboidratos. Ambos inibidores apresentaram pH ótimo de interação com alfa amilase pancreática de porco de 5,0 e, a pH 6,9, a complexação com a mesma enzima se deu na proporção de 1:1. Esses resultados, mais a composição de aminoácidos, indicaram que as características desses inibidores são semelhantes às de outros já purificados de diferentes variedades de feijão. As principais diferenças entre o IA do Jalo e do Argentino, foram observadas através de termogramas, do teor de carboidratos e dos ensaios imunológicos. Além disso, são sintetizados entre 20 e 30 dias após a floração, sendo que o processo ocorre simultaneamente ao da síntese das proteínas de reserva do grão. Inibidores purificados das variedades Jalo, Argentino e Rico 23, em diferentes fases do desenvolvimento, indicaram ausência de grandes alterações estruturais durante esse processo.

9- ABSTRACT

α -amylase inhibitors of bean (*Phaseolus vulgaris*) were characterized. The amylase inhibitor from Jalo had molecular weight of 50 kDa (by gel filtration), an isoelectric point of 4.75 and a carbohydrate content of 9.6%. Argentino presented molecular weight of 48 kDa, an isoelectric point of 4.90 and a carbohydrate content of 7.6%. The optimum pH for inhibition of porcine pancreatic α -amylase for both inhibitors was about 5.0 and they formed 1:1 stoichiometric complex. These results and the amino acid composition indicated that these inhibitors have characteristics similar to others already purified from beans. They were synthesized between 20 and 30 days after anthesis and this process occurred simultaneously to the storage proteins synthesis. Purified inhibitors from seeds in different phases of development indicated lack of great structural changes during this process.

10- INDICE DE TABELAS E FIGURAS (RESUMO)

Figura 1	Peso molecular (curva de calibração)	32
Figura 2	Focalização isoelétrica (curva de calibração)	35
Figura 3	Estabilidade a diferentes pHs	38
Figura 4	Estabilidade a diferentes temperaturas	39
Figura 5	pH ótimo de interação enzima-inibidor (Jalo)	40
Figura 6	pH ótimo de interação enzima-inibidor (Argentino) ...	41
Figura 7	Temperatura ótima de interação enzima-inibidor	42
Figura 8	Estequiometria (Argentino).....	47
Figura 9	Estequiometria (Jalo).....	48
Figura 10	Constante de dissociação (Jalo).....	50
Figura 11	Constante de dissociação (Argentino).....	51
Figura 12	Massa total e umidade (Jalo).....	54
Figura 13	Massa total e umidade (Argentino).....	55
Figura 14	Massa total e umidade (Rico 23).....	56
Figura 15	Massa seca, proteína e atividade (Jalo)	58
Figura 16	Massa seca, proteína e atividade (Argentino)	59
Figura 17	Massa seca, proteína e atividade (Rico-23)	60
Figura 18	Atividade específica - Jalo	62
Figura 19	Atividade específica - Argentino	63
Figura 20	Massa do IA-Argentino.....	66
Figura 21	Massa do IA-Jalo	67
Figura 22	Purificação do IA-Argentino (início do desenvol- vimento)	69
Figura 23	Purificação do IA-Argentino (final do desenvol- vimento)	70
Figura 24	Purificação do IA-Jalo (início do desenvolvimento)...	71
Figura 25	Purificação do IA-Jalo (final do desenvolvimento)....	72
Figura 26	Purificação do IA-Rico 23 (início do desenvolvimento)	73
Figura 27	Purificação do IA-Rico 23 (final do desenvolvimento).	74
Tabela 1	Peso molecular (tabela comparativa).....	33
Tabela 2	Teor de carboidratos e pI (tabela comparativa)	37
Tabela 3	Condições ótimas de interação (tabela comparativa)...	43
Tabela 4	Composição de aminoácidos	45

11- LISTA DE ABREVIATURAS

APP - alfa amilase pancreatica de porco

CM - proteína solúvel em clorofórmio e metanol (quando segue acompanhada de letras, são provenientes de cevada; quando acompanhada de números, são provenientes de trigo).

IA - inibidor de alfa amilase

IP - inibidor de protease

IQ - inibidor de quimotripsina

IS - inibidor de subtilisina

IT - inibidor de tripsina

LLP - lectin like protein

PAPI - probable amylase protease inhibitor

PHA - fitohemaglutinina

pI - ponto isoelétrico

PM - peso molecular

PR - proteína de reserva