UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-graduação em
Ciência dos Alimentos

PARÂMETROS ESTRUTURAIS DO INIBIDOR DE
 α -AMILASE DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris*)

FLAVIO FINARDI FILHO

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. FRANCO M. LAJOLO

São Paulo
1983

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Franco M. Lajolo pela sempre segura orientação.
- À CAPES pela bolsa de estudo concedida durante o curso de pós-graduação.
- Ao CNPq e a FINEP pelos auxílios financeiros a este trabalho.
- A todo pessoal do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
- A Celly Akemi Donomai pelo auxílio técnico na fase experimental final.
- A Elisabeth Garcia pela amizade, estímulo e alto grau de coleguismo.

SUMÁRIO

	pág.
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - OBJETIVOS	9
3 - MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 - Material	10
3.1.1 - Feijão	10
3.1.2 - Amilase salivar humana	10
3.1.3 - Reagentes	11
3.2 - Métodos	11
3.2.1 - Obtenção do inibidor de α -amilase	11
3.2.2 - Determinação da proteína	12
3.2.3 - Determinação de açúcares	12
3.2.4 - Atividade do IA	12
3.2.5 - Eletroforese em poliacrilamida	13
3.2.6 - Peso molecular	14
3.2.7 - Alterações Estruturais do IA	16
3.2.8 - Espectro de fluorescência	17
3.2.9 - Aminoácidos e aminoaçúcares	17
3.2.10 - Hidrólise enzimática	17
3.2.11 - Isolamento das sub-unidades	18
3.2.12 - Aminoácidos terminais	19

	pág.
4 - RESULTADOS	21
4.1 - Eletroforese em Gel de PAA	21
4.2 - Focalização Isoelétrica	21
4.3 - Peso Molecular	21
4.3.1 - Permeação em coluna	21
4.3.2 - Permeação em placa	23
4.3.3 - Eletroforese em PAA-SDS	23
4.4 - Alterações Estruturais do IA	23
4.5 - Alteração da Atividade Inibidora	28
4.6 - Espectro de Fluorescência	28
4.7 - Composição de Aminoácidos e Aminoaçúcares	28
4.8 - Hidrólise enzimática	28
4.9 - Separação das Sub-Unidades	31
4.9.1 - Cromatografia em gel	31
4.9.2 - Eletroforese preparativa	31
4.10 - Aminoácidos Terminais	33
4.10.1 - α -Amino terminal	33
4.10.2 - Carboxila terminal	34
5 - DISCUSSÃO	37
5.1 - Eficiência da Purificação	37
5.2 - Ponto Isoelétrico e Peso Molecular	38
5.3 - Padrões de Dissociação. Sub-Unidades	40
5.4 - Composição em Aminoácidos	43
5.5 - Resistência à Proteólise	44
5.6 - Separação Preparativa das Sub-Unidades	45
5.7 - Aminoácidos Terminais	47

	pág.
6 - CONCLUSÕES	50
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
SUMMARY	62
ABREVIATURAS	63

1 - INTRODUÇÃO

Os inibidores enzimáticos naturais têm sido objeto de estudo de vários grupos de pesquisadores sob ângulos diversos. Tais abordagens têm contribuído para a elucidação de aspectos bioquímicos das interações macromoleculares tipo proteína-proteína e proteína-polissacáride, e dos mecanismos da ação enzimática.

O assunto tem também atraído a atenção de botânicos pelo possível papel fisiológico desempenhado por esses inibidores. Ao mesmo tempo, essas moléculas vêm despertando interesse na área da farmacologia pelas possibilidades de aplicação como agentes terapêuticos.

Entretanto, é na área de ciência dos alimentos que esses inibidores têm sido mais estudados, seja por serem encontrados em vegetais que são largamente consumidos como alimentos, seja por inibirem enzimas do trato gastro-intestinal de mamíferos.

No reino vegetal, os inibidores enzimáticos são encontrados numa grande variedade de espécies dentro das famílias Leguminosae, Gramineae e Solanaceae. Por sua vez, são várias, as enzimas inibidas por estes compostos: tripsina, quimotripsina, peptidases, amilases, glicosidases^(37,55,60,74,80).

Entre os inibidores já detectados os de tripsina e quimotripsina têm sido os mais estudados e os que maiores consequên

cias tóxicas podem trazer aos animais que os ingerem na forma ativa⁽⁶⁰⁾. Seguem-se a eles, em importância, considerando os efeitos antinutricionais, os inibidores de α -amilase, aos quais daremos maior atenção por serem objeto deste trabalho.

Os inibidores de α -amilases (IA) começaram a ser mencionados na literatura científica a partir de 1945, através dos dados de BOWMAN⁽⁹⁾, que constatou a presença de um inibidor hidrossolúvel e termolábil no feijão.

Recentemente, após um intervalo onde poucos foram os trabalhos divulgados renovou-se o interesse nesse campo e hoje temos cerca de uma centena de artigos publicados referentes apenas aos 15 últimos anos. Esses trabalhos trazem informações sobre as diversas fontes para obtenção dos IAs, como são os microrganismos⁽²¹⁾, tubérculos^(19,24), cereais^(19,24,74) e leguminosas^(19,37), bem como relativos à sua especificidade de ação sobre enzimas de várias origens⁽⁷⁵⁾.

As α -amilases salivar e pancreática de mamíferos são as mais empregadas nas detecção e avaliações de atividade dos IAs^(19,26,34,45,82), mas existem também relatos de inibição de enzimas obtidas de fungos^(38,75), bactérias^(23,75), insetos^(10,16,34,54,75), animais marinhos⁽⁷⁵⁾ e outros vegetais^(34,75).

Entretanto o número de trabalhos é ainda pequeno; por exemplo, o papel fisiológico dos IAs em seus tecidos de origem ainda não foi esclarecido; apenas duas hipóteses já foram formuladas mas ainda não comprovadas. Uma delas se refere à possível ação reguladora do IA sobre a mobilização de amido durante a germinação. A outra é a de que essas substâncias seriam um eventual fator de resistência ao ataque de insetos.

Contrariando a primeira hipótese, verificou-se que não há alteração na atividade do IA durante a germinação do trigo⁽⁷⁴⁾ e que, com exceção do milho⁽⁷⁾ nenhum outro inibidor age sobre α -amilases endógenas^(34,50,74). Quanto ao segundo papel, são conhecidos casos de inibição de amilases de insetos que atacam trigo⁽⁵⁴⁾ e feijão⁽³⁴⁾, mas essa inibição não parece suficiente para deter a sua ação invasora⁽⁸⁶⁾.

A ação "in vivo" pela administração do IA em animais de laboratório tem também sido estudada de forma incipiente e pouco conclusiva^(25,32,34,56,63). Apenas nos ensaios com IA de feijão conduzidos por LAJOLLO⁽³⁴⁾ em ratos pode-se notar uma queda nos níveis séricos de glicose pós-prandial, consequentes à ingestão de uma dose de amido.

Em humanos o número de trabalhos é ainda menor, sendo conflitantes os resultados referentes ao aproveitamento do amido na presença do IA^(8,56). Essas áreas claramente necessitam de mais investigações.

As características físico-químicas da molécula tem sido os aspectos mais explorados nos estudos dos inibidores de α -amilase; já são conhecidos, para alguns deles, dados relativos à cinética de inibição^(10,82), necessidade de íons ativadores⁽³⁴⁾, especificidade frente a diversas enzimas^(12,21,22,31,34,75), bem como alguns detalhes da estrutura química^(3,22,43,43,48,49,76). Porém esses dados não se referem a um único inibidor não sendo, portanto, ainda possível ter um quadro integrado e, por exemplo, apontar os grupamentos químicos envolvidos na ligação enzima-inibidor. Como aconteceu com os inibidores de tripsina^(59,60) o esclarecimento destes pontos permitirá a compreensão do mecanismo

de ação dos IA, abrindo campo para possíveis aplicações.

A exemplo do que acontece com o mecanismo de ação, são também fundamentais investigações sobre a estrutura molecular. O interesse no estudo dos IAs de origem microbiana tem sido voltado principalmente para o campo farmacológico^(31,56,64) apesar disso porém em muito tem contribuído para o entendimento da relação estrutura-atividade do IA em geral. A grande maioria desses inibidores microbianos são polissacarídes contendo em sua molécula um átomo de nitrogênio em ligação glicosídica. Esta característica é comum às oligostatinas⁽⁴⁷⁾, às amilostatinas^(22,23,40), e aos compostos designados pelo prefixo BAY⁽⁶⁴⁾. Outros inibidores de origem microbiana, no entanto, são de composição estritamente protéica^(3,41) ou glicoprotéica⁽⁶¹⁾.

Dentre os vegetais, os IAs de cereais foram os mais estudados até agora. Particularmente no caso do trigo, tal é o número de inibidores de α -amilase encontrados, que houve necessidade de classificá-los em famílias quanto ao peso molecular ou quanto à mobilidade eletroforética⁽¹⁶⁾. Mesmo em cada família, várias são as frações com atividade anti-amilásica⁽¹⁰⁾, havendo inclusive divergência entre os autores quanto ao número real de IAs^(26,44,66,74).

As moléculas de IA de trigo se caracterizam por não conterem resíduos de açúcar⁽⁷⁴⁾ e serem cadeias protéicas únicas, sem subunidades⁽¹⁶⁾, porém podendo formar polímeros⁽¹⁰⁾. Outros aspectos estruturais foram relatados por PETRUCCI e cols.⁽⁴⁸⁾ e KASHLAN & RICHARDSON⁽⁴³⁾. Os primeiros demonstraram nas famílias 0,19 e 0,28 a semelhança em alguns aminoácidos da sequência das duas proteínas. KASHLAN & RICHARDSON descreveram a estrutura com-

pleta do inibidor de mobilidade eletroforética 0,28, que mostrou ser composta por 123 resíduos de aminoácidos, sem a presença de fenilalanina e histidina. Esta mesma sequência primária foi posteriormente comparada com a do inibidor de tripsina da cevada⁽⁴⁶⁾, revelando pontos homólogos.

A presença de IA em triticales, vegetal híbrido de centeio e trigo, foi por nós detectada pela primeira vez⁽¹⁹⁾. ROMANELLI^(*) estabeleceu a metodologia de separação de pelos menos três frações ativas frente às α -amilases de salivar humana e de pâncreas de porco.

No centeio, existe apenas um inibidor composto por duas cadeias peptídicas idênticas⁽²⁴⁾. Já no milho, uma única proteína revelou atividade anti-amilásica em testes com enzimas de insetos, de bactérias e do próprio milho, mas mostrou-se inativa sobre as de origem pancreática e salivar⁽⁷⁾.

Ainda entre os cereais, pode-se citar a presença de dois IAs em uma espécie originária da Índia, a Eleusina coracana (12, 69,70) com alta estabilidade térmica, sendo que um deles consegue também inibir a ação da tripsina⁽⁷¹⁾.

Os inibidores IAs protéicos, obtidos de tubérculos foram estudados principalmente em espécies de inhame (Colocasia esculenta⁽⁷²⁾, C. antiquorum⁽⁶⁷⁾, Dioscorea alata^(19,68) e Alocasia macrorrhiza⁽⁷²⁾) e dependendo da fonte de obtenção apresentam resíduos de açúcar variando de 0 a 64%. Esse elevado teor de açúcares tem comprometido os processos de separação dessas proteínas através de colunas cromatográficas⁽⁶⁸⁾ e eletroforéticas⁽¹⁹⁾.

(*)P.F.ROMANELLI, resultados não publicados.

Um dado comum aos inibidores do gênero *Colocasia* é a resistência ao ataque de algumas proteases, não havendo perda da atividade anti-amilásica⁽⁶⁷⁾. Sabe-se, também, que durante o crescimento da planta (*Colocasia antiquorum*), as atividades tanto do inibidor como da α -amilase endôgena diminuem⁽⁶⁷⁾, fazendo presupor uma ação integrada.

Em relação às leguminosas, a ocorrência de IA já foi demonstrada em algumas variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris*)^(19,34,37,38,50,52), amendoim (*Arachis hypogea*)⁽³⁰⁾ e grão-de-bico (*Cicer arietinum*)⁽⁷⁷⁾ e outros^(30,57).

Trabalhando com "feijão branco", MARSHALL & LAUDA⁽³⁸⁾ descreveram a purificação e algumas propriedades físico-químicas do inibidor de α -amilase que denominaram de faseolamina. Estes autores observaram a existência de área de 10% de carboidratos na molécula de 49000 daltons, que quando frente a α -amilase pancreática exibe um padrão de inibição não competitiva. A faseolamina possui alta especificidade pelas α -amilases de pâncreas de porco, de humanos, de saliva humana e do caramujo *Helix pomatia*.

O IA encontrado por LAJOLO⁽¹⁹⁷⁷⁾ em "feijão preto" apresenta basicamente as mesmas características da faseolamina. Em seu trabalho LAJOLO demonstra a necessidade da presença de íons Cl^- para a complexação da enzima pelo inibidor. A molécula deste inibidor, que contém 14,6% de açúcar, com $pI = 4,45$, dobra-se em três bandas glicoprotéicas distintas em eletroforese em meio denaturante. O IA do feijão preto inibe atividade das α -amilases de saliva humana, de pâncreas de porco, de banana, da larva da mosca *Rhyncosciara americana* e do caruncho do feijão *Acanthocelides*.

Ainda em feijão, POWERS & WHITAKER⁽⁵²⁾ comprovam a existência de sub-unidades num IA sem prolina na sua estrutura glicoprotéica. Os autores⁽⁵³⁾ inicialmente pensaram que a atividade estivesse ligada à porção glicídica da molécula, pois verificaram que após a oxidação desta com metaperiodato o IA torna-se inativo, e, além disso, experimentos conduzidos com maltose e amilase tripsinizada faziam supor que o inibidor não se deve ligar ao sítio ativo da enzima. Mas recentemente porém valendo-se de uma β -endo N-acetilglicosidase verificaram que a eliminação de 80% dos resíduos de açúcar não alterava a atividade inibidora^(*).

TANIZAKI⁽⁸²⁾, em continuação ao trabalho de LAJOLO⁽³⁴⁾, relata a presença de manose, xilose, galactose, glicosamina e galactosamina ligados à proteína. No estudo cinético a autora refere-se à formação de um complexo intermediário entre a enzima e o inibidor, explicando assim a necessidade de pré-incubação. Foram realizadas, no mesmo trabalho, reações de modificação química na α -amilase pancreática nos resíduos de histidina, tirosina e cisteína. No entanto, estas modificações não afetaram a formação do complexo enzima-inibidor.

A caracterização de uma glicoproteína do feijão branco com ação anti-amilásica que se divide em sub-unidades iguais, de peso molecular 15000, foi descrita por PICK e WÖBER⁽⁵⁰⁾. Em trabalho complementar⁽⁵¹⁾, através de técnica de imunoprecipitação, foi observado que os IAs encontrados em 7 diferentes cultivares de P. vulgaris são imunologicamente idênticos, e que a sín

(*) J.R. WHITAKER comunicação pessoal.

tese do inibidor parece ocorrer no estágio final de maturação da semente.

Na tentativa de estabelecer uma relação de atividade entre os inibidores de α -amilase do trigo e do feijão, foi realizado um teste com enzimas pancreáticas de sete espécies de mamíferos⁽²⁹⁾. O inibidor de trigo mostrou-se ativo frente a todas as enzimas; já o IA de feijão mostrou especificidade alta para α -amilase de cachorro, média para a de porco, baixa para a de coelho e nula para as demais (camundongo, rato, hamster e cobaia).

Esses resultados levam a pensar que a ação dos IAs deve estar intimamente relacionada à estrutura da molécula, a qual parece interagir em sítios específicos para cada enzima ensaiada, mostrando por outro lado a importância do estudo da sua estrutura e do mecanismo de ação.

Dando continuidade a trabalhos anteriores do nosso grupo, neste trabalho nos propusemos a estudar alguns aspectos físico-químicos adicionais da molécula do IA de feijão, confirmar dados anteriores, assim como buscar um sistema de separação das sub-unidades.

2 - OBJETIVOS

Neste estudo sobre o inibidor de α -amilase objetivou-se confirmar dados físico-químicos obtidos anteriormente, e ampliar o conhecimento da sua composição e de sua estrutura molecular. Entre os parâmetros considerados incluíram-se alguns referentes à estrutura primária, secundária e mesmo terciária da molécula do IA, de interesse na área de Ciência dos Alimentos.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material

3.1.1 - Feijão

Utilizaram-se sementes selecionadas de feijão preto, Phaseolus vulgaris, da variedade Rico 23, safra 77-78, (lote nº 04/78), fornecidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. O feijão foi armazenado à temperatura ambiente em frascos fechados ao abrigo de luz e umidade.

3.1.2 - Amilase salivar humana

A saliva foi coletada em nosso laboratório, adicionada de gotas de tolueno para evitar o crescimento de microrganismos, e mantida sob refrigeração. Posteriormente, o lote todo de saliva foi centrifugado por 30 min. a 8.000 x g, a 5°C, desprezando-se o resíduo. Ao sobrenadante adicionou-se acetona, recolhendo-se a fração precipitada entre 50 e 70% v/v do solvente. O precipitado, rico em α -amilase, foi dissolvido em tampão fosfato 0,1 M pH 6,9, 20 mM em NaCl e 20 μ M em CaCl_2 . Esta solução de

α -amilase foi armazenada em congelador a -18°C até o momento do uso.

3.1.3 - Reagentes

Sephadex G-100 médio e G-150 superfino e Sephacryl S-300 foram adquiridos da Pharmacia Fine Chemicals; albumina sérica de bovino, α -amilase pancreática de suino, tripsina, quimotripsina, aldolase, quimotripsinogênio A, dimetilsuberimidato, azul de dextrana, citocromo C, dodecil sulfato de sódio (SDS), 1-dimetilaminonaftaleno-5-sulfocloreto (cloreto de Dansil) e Tris (hidroximetil)aminometano (Tris) foram obtidos da Sigma Chemical Company; DEAE-celulose e papéis para cromatografia tipo 1 e 3MM foram da Whatman Limited; maltose e tubos de diálise da marca In lab.

A acrilamida e bis-acrilamida, ambas da BDH, foram recristalizadas antes do uso⁽⁷³⁾. Os demais reagentes foram todos de grau analítico.

3.2 - Métodos

3.2.1 - Obtenção do Inibidor de α -amilase

O inibidor de α -amilase (IA) foi extraído do feijão preto variedade Rico 23, seguindo as etapas de purificação já descritas por LAJOLO⁽³⁴⁾. Porém, em nossas separações suprimimos a

Última etapa, ou seja, a cromatografia em coluna de CM-celulose. Adicionou-se 0,02% de azida sódica à solução do IA purificado (~ 3mg/ml) subdividindo-a em frascos de 10 ml, que foram mantidos em congelador a -18°C e descongelados apenas quando necessário.

3.2.2 - Determinação da Proteína

Empregou-se o método descrito por LOWRY e cols.⁽³⁶⁾ para as análises rotineiras. A avaliação do conteúdo protéico nos eluatos das colunas cromatográficas foi feita pela leitura espectrofotométrica em 280 nm.

3.2.3 - Determinação de Açúcares

A fração glicídica do inibidor foi determinada pelo reativo de fenol-ácido sulfúrico, segundo DUBOIS e cols.⁽¹⁸⁾.

3.2.4 - Atividade do IA

A atividade do IA foi avaliada através da reação com ácido 3,5 dinitrossalicílico, método de BERNFELD⁽⁶⁾ adaptado por LAJOLO⁽³⁴⁾. Este autor estabeleceu a unidade de inibição de α -amilase (UIA) como sendo a inibição total de 10 unidades de α -

-amilase (UA), ou seja, 10 μ Moles de maltose liberados/ml/min , a 37°C.

3.2.5 - Eletroforese em Poliacrilamida

As eletroforeses em poliacrilamida (PAA) foram realizadas tanto em tubos de 0,5 cm de diâmetro interno por 6 cm de altura como mais longos, de 0,5 cm x 10 cm.

3.2.5.1 - Meio alcalino

A eletroforese PAA, segundo DAVIS⁽¹³⁾, foi empregada rotineiramente como método de avaliação da pureza das preparações de IA. As bandas proteicas foram reveladas com azul de Coomassie , enquanto os resíduos de açúcar pela reação com fucsina⁽⁶⁵⁾.

3.2.5.2 - Meio ácido

Também como teste complementar de pureza das preparações, foram realizadas corridas eletroforéticas em tampão de β -alanina⁽⁵⁸⁾.

3.2.5.3 - Meio neutro contendo SDS

Empregou-se o método de WEBER & OSBORN⁽⁸⁴⁾ em escalas analíticas ou preparativa, quando foi necessário obter-se quantidades maiores de IA.

3.2.5.4 - Focalização isoeletrica

Para determinação do ponto isoeletrico (pI) do IA foram empregados geis de 9 cm de comprimento, com 7,5% de acrilamida e 2% de anfólitos na faixa de pH entre 4,0 e 6,0⁽⁸⁵⁾. Aplicou-se uma diferença de potencial de 20 V/cm de gel durante 20 h, ou até que o equilíbrio fosse estabelecido, mantendo-se a temperatura entre 5 e 7°C.

Após a corrida os geis foram seccionados em cortes transversais de 3 mm de espessura, que foram mergulhados em água deionizada e o pH medido após decorridas 8 horas para permitir a difusão dos anfólitos.

3.2.6 - Peso Molecular

3.2.6.1 - Cromatografia em coluna

O IA foi cromatografado em coluna de 0,6 x 95 cm através de Sephadex G-100⁽²⁾, equilibrada com tampão fosfato 0,05 M pH 6,9. Os padrões de peso molecular empregados na calibração da coluna foram albumina bovina (67.000), ovalbumina (40.000), quimotripsinogênio A (24.000) e citocromo C (12.500). A separação foi seguida a 280 nm para todas proteínas, além de leituras em 412 nm para o citocromo C e, com ensaios de atividade, para o IA.

3.2.6.2 - Cromatografia em placas

Suspensão de Sephadex G-150 superfino foi espalhada so bre placa de 20 x 20 cm, numa camada de 1 mm, conforme especificações do fabricante. A placa foi equilibrada durante 24 h com 0,35 ml/hora. Foram utilizadas as mesmas proteínas do item anterior acrescidas de aldolase (158.000) e ferritina (540.000)⁽²⁾, esta última como marcadora de frente de migração. Sobre a placa foram aplicados 5 µg de cada proteína, desenvolvendo-se a migração da frente em 6,5 h.

A migração foi interrompida pela reposição da placa na horizontal, revelando-se o resultado por contato com papel cro matográfico 3 MM que, após a secagem, foi mergulhado em solução de azul de Coomassie em ácido acético-metanol (1:9).

3.2.6.3 - Eletroforese em PAA-SDS

O método descrito em 3.2.5.3 foi empregado também para a determinação de peso molecular⁽⁸⁴⁾, com a corrida, em paralelo, das proteínas de peso molecular conhecido: lisozima (14.300), β-lacto-albumina (18.400), tripsinogênio (24.000), pepsina (34.700), ovalbumina (45.000) e albumina sérica (66.000).

Tanto neste como nos métodos anteriores a avaliação do peso molecular foi realizada graficamente, através da relação en tre log do peso molecular e o deslocamento ou volume de eluição.

3.2.7 - Alterações Estruturais do IA

3.2.7.1 - Agentes dissociantes

Foram empregados meios contendo SDS, uréia, guanadina e β -mercaptoetanol a fim de romper a estrutura terciária do IA e liberar as sub-unidades^(11,15). Os meios denaturantes, nos quais o IA foi dissolvido, foram todos tamponados com fosfato 0,1 M pH 6,9, contendo: 1) SDS 1%, uréia 6M e β -mercaptoetanol 1%; 2) SDS 1% e β -mercaptoetanol 1%; 3) SDS 1%; 4) uréia 6M; e 5) guanidina 6 M. Nestes meios, as amostras foram aquecidas a 37^oh por 2 h.

3.2.7.2 - Reagente bifuncional

A reação do IA com dimetilsuberimidato (DMS) foi executada a pH 8,5, em tampão 0,2 M de trietanolamina, durante 3 h a 37^oC⁽¹⁴⁾. Após a reação o material foi submetido a eletroforese em PAA-SDS.

A remoção dos reagentes em todos os tratamentos foi realizada por diálise durante 24 h contra água destilada, seguindo-se 12 h com tampão fosfato. O SDS foi removido do meio através da passagem do material por resina de troca iônica, AG 1 x 8, em colunas de 3 ml⁽³⁵⁾.

3.2.8 - Espectro de Fluorescência

Foram registrados os espectros de emissão de fluorescência do IA integro e após tratamentos com SDS e guanidina 6 M, fixando-se o comprimento de onda de excitação em 280 nm.

3.2.9 - Aminoácidos e Aminoacúcares

Procedeu-se a análise de aminoácidos totais segundo SPACKMAN e cols.⁽⁷⁸⁾. A cistina foi determinada via oxidação a ácido cistêico⁽³⁹⁾.

As amostras foram hidrolisadas em HCl 6 N, em tubos com tampa rosqueável, sob atmosfera de N₂, a 110°C por 22, 48 e 72 h.

A preparação para análise de aminoacúcares exigiu uma hidrólise na mesma temperatura, porém com HCl 4 N durante 4 e 6 h ⁽⁷⁹⁾.

3.2.10 - Hidrólise Enzimática

O IA na sua forma ativa foi submetido a ação de proteases do tubo digestivo - pepsina, quimotripsina e tripsina - e de origem fúngica (Streptomyces griseus). Periodicamente foram retiradas alíquotas para controles de atividade anti-amilásica residual e de ruptura de ligações peptídicas pela reação com ninhidrina.

As soluções enzimáticas usadas tinham uma concentração

de 150 $\mu\text{g/ml}$, nos seguintes meios: pepsina e tripsina em solução de HCL 0,05 N; quimotripsina e pronase em solução de tampão fosfato 0,02 M pH 7,6 e pH 6,9, respectivamente. A atividade proteolítica das enzimas foi avaliada frente a caseína: 6 mg de substrato e 150 μg de enzima, em 2 ml, foram incubados por 5 min a 37°C; a reação foi então interrompida por adição de 1 ml TCA 50%. Após centrifugação a 12.000 x g o sobrenadante foi lido a 280 nm, expressando-se a atividade em incremento da absorbância/ $\mu\text{g/min}$. A mesma proporção enzima-substrato foi empregada nos ensaios com o IA, tanto a 37°C como a 55°C⁽⁶²⁾.

3.2.11 - Isolamentos das Sub-unidades

3.2.11.1 - Cromatografia em gel

Mantendo-se as condições denaturantes do meio, o IA foi cromatografado em Sephadex G-100, Bio-Gel P100 e Sephacryl S-300.

A separação em Sephadex G-100⁽¹¹⁾ foi realizada em coluna de 1,2 x 85 cm, equilibrada com tampão fosfato 0,02 M pH 7,6, SDS 1%, sob fluxo constante de 30 ml/h, coletando-se frações de 3 ml. À coluna foram aplicados 4 mg de proteína do IA, previamente tratados com SDS-uréia-mercaptoetanol como descrito em 3.2.7.1.

Em gel de poliacrilamida, Bio-Gel P100, empregou-se uma coluna de 2 x 60 cm, seguindo-se as mesmas condições anteriores.

A cromatografia em Sephacryl S-300⁽⁵⁾ foi realizada ,

em coluna de 2 x 60 cm, em meio contendo guanidina 6 M (item 3.2.7.1) sob fluxo de 12 ml/h.

Após cada separação, procedeu-se a análise eletroforética PAA-SDS das frações proteicas resultantes da separação.

3.2.11.2 - Eletroforese preparativa

Conforme citado em 3.2.5.3 realizamos a separação eletroforética das frações do IA em meio a 1% de SDS, nas condições descritas a seguir.

25 mg de IA denaturado (3.2.7.1) foram aplicados sobre o gel de concentração da coluna de 2,5 x 20 cm de acrilamida 10% - SDS 1%. A potência foi mantida constante em 5 watts, durante as 13 h de corrida a temperatura de 18°C termostatizada.

Ao término de cada corrida, o gel foi removido da coluna por pressão de ar e seccionado transversalmente de 5 em 5 mm. Um pequeno setor circular foi retirado de cada corte para fixação e revelação das bandas proteicas com azul de Coomassie. O restante do corte foi triturado em água para facilitar a eluição das sub-unidades separadas que foram obtidas do gel por centrifugação e filtração dos resíduos de poliacrilamida.

3.2.12 - Aminoácidos Terminais

3.2.12.1 - Grupo amina

Marcou-se o IA com cloreto de Dansil segundo GRAY (27) com posterior hidrólise da proteína em HCl 6 N. Após eletrofo-

rese em papel ou cromatografia em placas de poliamida os amino - ácidos marcados foram identificados sob luz U.V. por comparação com padrões específicos.

Na eletroforese utilizou-se tampão piridina-ácido-acético-água (10:20:2500), à temperatura constante de 7°C durante as 3 h de corrida, aplicando-se uma potência constante de 10 W e corrente de 8 mA.

Na cromatografia bidimensional, em placas de poliamida 5 x 5 cm, empregaram-se os seguintes sistemas solventes: 1) água-ácido fórmico 90% (200:3); 2) benzeno-ácido acético glacial (9:1); 3-acetato de etila-metanol-ácido acético (20:1:1). Os solventes 2 e 3 correm no mesmo sentido, perpendicularmente ao solvente 1.

Foram analisados por esta metodologia o IA integro e a fração principal obtida da eletroforese preparativa.

3.2.12.2 - Grupo carboxila

Empregou-se carboxipeptidase A na proporção molar 1:20 enzima-inibidor⁽¹⁾. Para tanto o inibidor foi oxidado com ácido perfórmico e dissolvido em tampão TRIS 0,2 M pH 8,5. A solução final (1,09 μ Moles/ml de IA) foi incubada a 37°C e alíquotas foram sendo retiradas ao longo da hidrólise. Após a inibição com ácido acético o sobrenadante foi secado em dessecador a vácuo durante a noite. O resíduo foi dissolvido em tampão citrato 0,2 M pH 2.2 e identificados e quantificados em analisador de aminoácidos.

4 - RESULTADOS

4.1 - Eletroforese em Gel de PAA

O inibidor de amilase isolado foi submetido à eletroforese em dois sistemas distintos a fim de se comprovar a existência de apenas uma banda protéica. Os esquemas de migração eletroforética a que nos referimos encontram-se na Figura 1, confirmando a homogeneidade da preparação.

4.2 - Focalização Isoelétrica

A Figura 2 apresenta o gradiente de pH ao longo do gel e a localização da banda do IA, com indicação do ponto isoelétrico que foi 4,35.

4.3 - Peso Molecular

4.3.1 - Permeação em Coluna

O perfil de eluição do IA e das demais proteínas indicadoras de peso molecular, em coluna de Sephadex G 100, é mostra

Figura 1 - Perfil eletroforético do IA isolado obtido em gel com 7,5% de acrilamida: a) tampão tris-glicina pH 8,3; b) tampão β -alanina pH 4,3.

Figura 2 - Perfil da focalização isoeletrica do IA em gel de PAA; mistura de anfólito entre pH 4 e pH 6.

do na Figura 3. O peso molecular calculado graficamente foi de 56.000 ± 2.500 daltons.

4.3.2 - Permeação em placa

O peso molecular do IA obtido pela corrida em camada delgada de Sephadex G-150 superfino foi de 53.000 ± 1.500 daltons (Figura 4).

4.3.3 - Eletroforese em PAA-SDS

A Figura 5 mostra um esquema da migração eletroforética do IA em gel de PAA-SDS juntamente com as proteínas de referência para este meio. As bandas protéicas são designadas pelas letra a até e, correspondendo respectivamente a 49.000-56.000 , 32.000, 17.500, 16.000 e 13.500 daltons.

4.4 - Alterações estruturais do IA

Na Figura 6 encontra-se esquematizado o perfil eletroforético do IA obtido em PAA-SDS, após os tratamentos com agentes dissociantes e com dimetilsuberimidato (DMS).

Figura 3 - Perfil cromatográfico do IA obtido em Sephadex, bem como das proteínas indicadoras de peso molecular: 1) azul de dextrana; 2) albumina sérica; 3) ovalbumina; 4) quimotripsinogênio A; 5) citocromo C. No quadro inserido incluíram-se as retenções das proteínas relativas ao azul de dextrana em função do peso molecular dos padrões.

Figura 4 - Migração do IA em placa de Sephadex G-150 superfino. No quadro inserido expressam-se os deslocamentos das proteínas em função dos pesos moleculares: 1) citocromo C; 2) quimotripsinogênio A; 3) ovalbumina; 4) albumina bovina; 5) aldolase; 6) ferritina. A flecha indica a posição do IA.

Figura 5 - Esquema do perfil eletroforético do IA obtido em géis de PAA-SDS. Os padrões de peso molecular foram: 1) albumina sérica; 2) ovalbumina; 3) pepsina; 4) tripsinogênio; 5) β -lacto-albumina; 6) lisozima. No quadro está representado a migração das proteínas em função dos pesos moleculares; as setas indicam a localização das bandas obtidas na corrida, cujos PM foram: a) 49.000-56.000; b) 32.000; c) 17.500; d) 16.000 e e) 13.500.

Figura 6 - Eletroforese do IA em PAA-SDS após tratamento com: a) SDS 1%, uréia 6M e β -mercaptoetanol 1%; b) SDS 1% e β -mercaptoetanol 1%; c) SDS 1%; d) uréia 6 M; e) guanidina 6 M; f) dimetilsuberimidato.

4.5 - Alteração da Atividade Inibidora

A Tabela 1 expressa os resultados de atividade residual do IA após os diversos tratamentos químicos aplicados.

4.6 - Espectro de Fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência tanto do IA intacto como das suas formas denaturadas encontram-se na Figura 7.

4.7 - Composição de Aminoácidos e Aminoaçúcares

A Tabela 2 traz a composição de aminoácidos e aminoaçúcares do IA em número de resíduos por molécula, segundo as diversas condições de hidrólise.

4.8 - Hidrólise enzimática

As proteases empregadas na tripsina (0,78V), quimotripsina (1,10 V), pepsina (0,35 V) e promase (1,52 V), foram ineficientes na hidrólise do IA. Não houve alteração durante essas experiências do número de resíduos de $-NH_2$ e da atividade inibidora de α -amilase ao longo das 72 h a 37°C ou a 55°C.

Tabela 1 - Alteração da atividade do IA após tratamentos químicos.

Tratamento	Atividade residual (%)
SDS-urêia-mercaptoetanol	< 5
SDS-mercaptoetanol	< 5
SDS	< 5
Urêia	55
Guanidina	100
Dimetilsuberimidato	87

Figura 7 - Espectro de emissão de fluorescência do IA em tampão fosfato 0,05M pH 6,9.

Tabela 2 - Número de resíduos de aminoácidos e aminoaçúcares do IA.

Compostos	Tempo de hidrólise	22	48	72	Número considerado
ácido aspártico		77,1 ^a	70,9 ^a	73,5 ^a	77
treonina		30,3	31,5	32,3	32
serina		52,2	49,7	51,9	52
ácido glutâmico		32,0	33,3	35,5	36
prolina		12,2	11,6	12,7	13
glicina		19,9	19,4	19,9	20
alanina		23,1	21,6	22,4	23
1/2 cistina ^b		1,1	n.d.	1,2	1
valina		23,1	31,8	35,5	36
metionina		3,1	2,5	—	3
isoleucina		11,2	15,4	17,5	18
leucina		16,7	18,6	19,8	20
tirosina		14,0	15,9	15,7	16
fenilalanina		20,4	21,6	22,9	23
histidina		10,8	n.d.	15,4	15
lisina		2,2	n.d.	2,2	2
arginina		9,4	n.d.	13,3	13
glicosamina		2,1 ^c	2,0 ^d		2
galactosamina		—	—		—

a) hidrólise em HCl 6N;

b) determinado como ácido cistêmico;

c) hidrólise em HCl 4n durante 4 h;

d) idem durante 6 h.

4.9 - Separação das Sub-Unidades

Na tentativa de isolar as sub-unidades identificadas na eletroforese PAA-SDS, foram utilizadas técnicas de separação de peptídeos em condições denaturantes, cujos resultados são apresentados a seguir.

4.9.1 - Cromatografia em Gel

O perfil de eluição do IA em Sephadex G-100, Bio-Gel P-100 e Sephacryl S-300, com os correspondentes esquemas de mobilidade eletroforética em PAA-SDS encontram-se nas Figuras 8, 9 e 10, respectivamente.

4.9.2 - Eletroforese Preparativa

O método eletroforético em PAA-SDS foi adaptado para utilização no sistema de eletroforese preparativa Uniphor (LKB-Suécia). Os setores circulares corados com Coomassie revelaram a presença das mesmas bandas protéicas descritas anteriormente. As frações do gel após identificação foram separadas, trituradas e extraíram-se as proteínas como descrito em 3.2.11.2. O rendimento da operação foi ao redor de 60%.

Figura 8 - Cromatografia em Sephadex G-100 do IA em tampão fosfato SDS e esquema de eletroforese em PAA-SDS da proteína do pico de eluição.

Figura 9 - Cromatografia em Bio-Gel P-100 do IA em tampão fosfato-SDS e esquema de eletroforese em PAA-SDS das proteínas dos picos de eluição.

Figura 10 - Cromatografia em Sephacryl S-300 do IA em tampão fosfato guanidina 6 M e esquema da eletroforese em PAA-SDS do pico de eluição.

4.10 - Aminoácidos terminais

4.10.1 - α -Amino Terminal

Os resultados da marcação do IA com cloreto de Dansil são mostrados nas Figuras 11 e 12.

Figura 11 - Eletroforese em papel do hidrolisado do IA marcado com Dansil-HCl: P₁ e P₂ padrões de dansil-aminoácidos

4.10.2 - Carboxila Terminal

Os aminoácidos liberados pela ação da carboxipeptidase A encontram-se na Figura 13.

Figura 12 - Cromatografia de dansil-aminoácidos em placas de poliamida; as setas indicam o sentido de corrida dos sistemas solventes: 1) água-ácido fórmico 90% (200:3); 2) benzeno-ácido acético (9:1); 3) acetato de etila-metanol-ácido acético (20:1:1). a) IA integral; b) bandas c e d obtidas por eletroforese preparativa em PAA-SDS (Ver Figura 5).

Figura 13 - Liberação de aminoácidos do IA pela carboxipeptidase A em função do tempo de incubação a 37°C e identificação do provável terminal.

5 - DISCUSSÃO

5.1 - Eficiência da Purificação

A purificação do IA descrita por LAJOLO⁽³⁴⁾ inclui a passagem por colunas cromatográficas de DEAE-celulose, Sephadex G-100 e CM-celulose, porém em nosso caso suprimimos esta última etapa, pois as frações obtidas em Sephadex já demonstraram estar isentas de contaminação (Fig. 1). Com a eliminação da coluna de CM-celulose atingimos em nossas preparações o mesmo rendimento descrito por MARSHALL & LAUDA⁽³⁸⁾, de cerca de 32%.

Convém ainda mencionar que ocasionalmente foi detectada a presença de uma glicosidade em algumas preparações através de técnica por nós desenvolvida⁽¹⁹⁾ para identificação de IA em extratos vegetais. Essa técnica se baseia na corrida eletroforética em gel contendo amilopectina, seguida de incubação com amilase e revelação com solução de iodo; a região do gel correspondente à posição do IA cora-se em azul pois aí a ação hidrolítica de α -amilase é bloqueada e a amilopectina da coluna não é digerida. Omitindo-se a α -amilase no meio de incubação a técnica permite revelar a presença de outras glicosidases, como foi o caso.

Essa contaminação detectada nas nossas preparações do IA não foi considerada relevante porque nos ensaios para a avalia

ção da atividade inibidora sempre incluíamos um "branco" sem a presença de α -amilase. Além disso verificamos que ela representa menos de 1% do inibidor. É importante salientar de qualquer forma que a contaminação não detectada mesmo pelo método de coloração de proteína com o azul de Comassie normalmente usado cuja sensibilidade se situa em torno de 0,5 μ g de proteína no gel.

5.2 - Ponto Isoelétrico e Peso Molecular

O ponto isoelétrico (pI) da proteína do inibidor foi determinado por eletroforese pelo emprego de anfólitos entre pH 4,0 e pH 6,0, resultando apenas uma banda ao nível de pH 4,35 (Fig. 2). Por sua vez, o IA do feijão estudado por POWERS & WHITAKER⁽⁵²⁾ apresentou duas bandas protéicas, a maior com pI 4,65 e a menor com pI 4,5. Divergente também é o pI 5,2 demonstrado por PICK & WÖBER⁽⁵⁰⁾ para preparações recentes do IA de feijão, alterando-se para pI 4,8 e 5,5 quando determinado em preparações antigas. O IA por nós obtido não mostrou qualquer mudança do pI ao longo de meses.

A determinação do peso molecular do IA foi realizada através de permeação em gel de dextrana⁽²⁾ e eletroforese em PAA-SDS⁽⁸⁴⁾. Os valores obtidos por cromatografia em Sephadex foram 56.000 daltons em coluna (Fig. 3) e 53.000 daltons em placa (Fig. 4), situando-se bem próximos daqueles descritos por outros autores. MARSHALL & LAUDA⁽³⁸⁾ e POWERS & WHITAKER⁽⁵²⁾ concordam quanto ao peso molecular do IA, atribuindo-lhe 49.000 daltons, ambos obtidos através de coluna cromatográfica em Sephadex G-100. PICK

& WÖBER⁽⁵⁰⁾ empregando a mesma metodologia obtiveram um valor inferior, de 43.000 daltons.

Por outro lado, a determinação do peso molecular por eletroforese em PAA-SDS nos forneceu 5 bandas glicoprotéicas (Fig. 5). Destas, as bandas c, d e e são as que desenvolvem coloração mais intensa tanto com Coomassie como com fucsina, correspondendo a pesos moleculares de 17.500, 16.000 e 13.500 daltons respectivamente. Das demais, a banda b (32.000) está sempre presente, apesar de seu baixo contraste, porém a banda a é revelada apenas ocasionalmente, situando-se dentro da faixa de 49.000 a 56.000. Este fato foi devido provavelmente a artefatos de técnica onde haveria resíduos de inibidor não dissociados, mantendo-se a sua estrutura terciária. LAJOLO⁽³⁴⁾ atribuiu ao inibidor do feijão um peso molecular de 29.000 daltons, pois considerou como inibidor não dissociado residual um peptídeo de mobilidade semelhante à nossa banda b, o qual, coincidentemente, tenha um PM que era a soma das duas outras por ele encontradas, justificando a interpretação dada.

Com base nesses dados pudemos concluir que o peso molecular do IA é de 53.000 daltons e passamos a usar esse valor para os cálculos que envolveram a expressão da concentração em molaridade.

5.3 - Padrões de Dissociação. Sub-unidades

A partir dos dados da eletroforese em PAA-SDS (Fig. 5) pode-se detectar a existência de sub-unidades na molécula do IA, já evidenciados anteriormente⁽³⁴⁾. A fim de confirmar o número de sub-unidades presentes e compreender melhor o papel dos agentes dissociantes e/ou denaturantes sobre a cadeia protéica do IA, foram escolhidos os meios de tratamento descritos em 3.2.7.1. Sabe-se que a ação da uréia e da guanidina em concentrações elevadas (6-8M) se dá sobre as ligações não peptídicas de baixa energia, rompendo-as. As pontes S-S, por seu lado, são suceptíveis ao ataque de compostos redutores como o β -mercaptoetanol. Resta ainda citar o papel desempenhado pelos detergentes na denaturação de proteínas, porém o mesmo ainda não foi totalmente esclarecido, havendo apenas informações isoladas. Por exemplo, é sabido que o SDS liga-se a 10 ou 11 pontos da molécula de albumina sérica provocando sua denaturação, e que β -lactoglobulina é completamente denaturada em concentrações da ordem de 3mM de SDS⁽⁸¹⁾.

A Figura 6 mostra as alterações no comportamento eletroforético do IA quando a uréia foi usada como único agente denaturante. A explicação para essas alterações poderia ser dada pela reação entre produtos de degradação da uréia (cianato) e a proteína, comprometendo-a irreversivelmente⁽⁸¹⁾. Entretanto, um teste que envolveu a incubação prévia com cianato nos demais meios denaturantes não causou alterações no comportamento eletroforético do IA, refutando a hipótese levantada.

Ainda na Figura 6, pode-se notar que as ausências de β -mercaptoetanol e uréia não afetaram o padrão de migração do meio

com SDS, mostrando ser o detergente o único responsável pela dissociação. Estes dados levam-nos a crer que não há pontes dissulfeto entre as sub-unidades do IA. Por outro lado, aparentemente, a guanidina e o SDS se equivalem e provocam um mesmo padrão de dissociação do inibidor.

A finalidade da reação com DMS, reagente bifuncional, foi a de estabilizar a estrutura nativa do IA através de ligações cruzadas intra-moleculares. Como resultado tivemos uma banda de coloração intensa (Fig. 6f) que se situa nas proximidades da banda a (Fig. 5). Ao mesmo tempo houve uma diminuição na intensidade da cor das demais bandas, levando-nos a supor que essa banda deva ser a forma não dissociada.

POWERS & WHITAKER⁽⁵²⁾ também referem ao aparecimento de novas bandas eletroforéticas de maior peso molecular após a reação com DMS. As sub-unidades encontradas por esses autores coincidem com as nossas, inclusive no que se refere à separação pouco distinta entre as bandas c e d. Mencionam também a não interferência do mercaptoetanol na resolução das proteínas.

O efeito da dissociação — reassociação também foi uma preocupação nesse estudo.

A medida da atividade residual após os tratamentos dissociantes (Tabela 1) mostrou que apenas aqueles que incluíam SDS não permitiam o rearranjo da molécula a ponto de restaurar a sua atividade inibidora. A reativação com guanidina foi total e com uréia da ordem de 50%.

Os resultados obtidos com guanidina e SDS são aparentemente contraditórios, uma vez que na eletroforese ambos levavam a sub-unidades idênticas que deveriam se reassociar de forma seme

lhantes e levar à um mesmo grau de reativação. Essa aparente contradição pode ser explicada pela presença residual dessas forte - mente ligada às cadeias peptídicas, já que como é sabido por tro - ca iônica não se consegue remover mais do que qualquer porcenta - gem do detergente ligado⁽³⁵⁾.

O IA do trigo parece possuir propriedades diferentes , por exemplo, sua reativação após remoção de SDS foi conseguida pelo grupo de SILANO⁽¹⁶⁾. O'CONNOR & McGEENEY⁽⁴⁴⁾ também se refe - rem a reativação pela retirada do detergente, porém apenas na au - sência de mercaptoetanol o fato parece demonstrar a importância de pontes dissulfito naquele inibidor.

O tratamento com DMS como era previsível manteve a ati - vidade inibidora com perdas aplicáveis pela propriedade desse reagente de participar em ligações intra e inter-moleculares.

Além de avaliar a atividade inibidora seguimos a dissociação-reassociação do IA através do seu espectro de emissão de fluorescência obtido em várias situações (Fig. 7). Nota-se no espectro que a fluorescência máxima tanto da amostra controle co - mo da tratada com guanidina acontece a 323 nm e para a tratada com SDS, a 332 nm. Além disso, ocorre um pico secundário a 276 nm a - penas nas amostras tratadas, evidenciando-se assim uma exposição de grupos aromáticos. Esse fato indica que a molécula do IA que apesar de manter a atividade, pela reassociação, sofre mudanças estruturais apenas detectáveis por métodos físicos.

É conveniente citar ainda que em testes preliminares com guanidina na 6M pudemos também notar estas mesmas alterações (na faixa de absorção de aromáticos (275 nm) através de dicroismo cir - cular os resultados não foram incluídos por estarem incompletos .

Como relata TANFORD⁽⁸¹⁾ a concentração mínima de guanidina que provoca a denaturação deve ser comprovada através de dicroísmo circular, dispersão ótica rotatória (ambas no VV afastado), viscosidade intrínseca e outros.

5.4 - Composição em Aminoácidos

Observando-se a Tabela 2 podemos notar que quase a meta de dos 400 resíduos de aminoácidos refere-se a soma de ácido aspártico, treonina, serina e ácido glutâmico. O IA foi ainda hidrolisado com ácido p-toluenossulfônico para análise de triptofano, porém devido à presença de glicosamina não foi possível uma boa resolução que permitisse a quantificação segura, porque o pico correspondente a cor desenvolvida, pela reação de ninhidrina com os dois resíduos de glicosamina, foi mais intensa do que para o ombro formado pelo triptofano. Ainda pela Tabela 2, a presença de 13 resíduos de prolina faz descartar a hipótese de estarmos trabalhando com o mesmo inibidor de POWERS & WHITAKER⁽⁵²⁾, uma vez que este resíduo não se encontra presente naquele inibidor. Outras diferenças existem entre os teores de lisina e histidina, com respectivamente 2 e 15 resíduos em nossos IA entre 17 e 5 no IA estudado por eles.

Os aminoaçúcares detectados por TANIZAKI⁽⁸²⁾ através de cromatografia em papel foram glicosamina e galactosamina; nós confirmamos a presença apenas do primeiro, com dois resíduos por moléculas de inibidor.

5.5 - Resistência à Proteólise

Buscamos durante o desenvolvimento do trabalho formas que pudessem nos conduzir a uma fração ativa do IA, que, uma vez isolada, permitisse o estudo de suas propriedades físico-químicas e bioquímicas. Desse modo resolvemos seguir dois caminhos distintos: hidrólise-enzimática do IA e separação preparativa das sub-unidades.

A hidrólise enzimática foi planejada no sentido de se obter um pequeno número de peptídeos ou glicopeptídeos rompidos em ligações peptídicas específicas. Foi utilizada inicialmente a tripsina que romperia ligações envolvendo lisina e arginina, porém depois de várias experiências tivemos sempre resultados nulos. Paralelamente aos ensaios foram tomadas alíquotas para: controle da liberação de aminoácidos, através da reação com ninhidrina, de glicopeptídeo, pela reação com fenol-ácido sulfúrico⁽¹⁸⁾, e da atividade residual. Entretanto, todos parâmetros analisados confirmaram a resistência do IA ao ataque da tripsina, mantendo a mesma atividade do inicial.

Partimos então para outras enzimas, começando da mais específica, quimotripsina, para a menos específica, protease fúngica. Com todas porém, os resultados nulos se repetiram. Estes dados não foram ainda relatados em feijões, entretanto autores trabalhando com trigo⁽⁴⁴⁾, inhame^(67,68) e Eleusine coracana⁽⁷⁰⁾ também mencionam a resistência ou inativação dos inibidores pela ação de proteases. Dos quatro inibidores isolados do trigo por O'CONNOR & McGEENEY⁽⁴⁴⁾ apenas um é inativado por tripsina e quimotripsina. A tripsina destrói também os inibidores do centeio⁽²⁴⁾, um dos

inibidores de E. coracana⁽⁷⁰⁾ e o do inhame da espécie Dioscorea alata⁽⁶⁸⁾. Semelhantes à do feijão é a resistência proteólise do IA do inhame, da espécie Colocasia antiquorum⁽⁶⁷⁾, o qual não é afetado por pepsina, tripsina, quimotripsina e tão pouco pela pronase.

5.6 - Separação Preparativa das Sub-Unidades

Para a separação das sub-unidades foram empregadas geis de diversos tipos. A cromatografia em Sephadex G-100 (Fig. 8) não permitiu uma separação em meio a SDS-tampão fosfato, pois o único pico resultante apresenta todas as bandas eletroforéticas já demonstradas. A passagem por coluna de Bio-Gel P-100 por sua vez (Fig. 9) permitiu uma separação parcial das proteínas isolando das demais a banda b, que aparece desdobrada em duas com pequeno contraste na inferior. Mesmo assim, persistia o nosso problema de separação das demais frações.

Conhecendo-se a alta resolução conferida pelo Sephacryl⁽⁵⁾ e, ainda, a possibilidade de seu uso com soluções viscosas sem acarretar demasiado empacotamento do gel, definimo-nos por uma separação com esse gel na presença guanidina 6 M. Apesar disso não houve a separação das sub-unidades e o pico de resolução da proteína mostrou a existência das bandas b, c, d e e, em eletroforese PAA-SDS.

Pela literatura a separação de sub-unidades de moléculas protéicas por Sephadex-SDS, parece ser eficiente somente quando as frações tiverem pesos moleculares bem distantes um do ou-

tro⁽¹¹⁾, o que não ocorre em nosso caso. Entretanto, em Bio - Gel P-100 (Fig. 9) conseguimos uma separação ao menos parcial da sub-unidades de 32.000 daltons, daquelas de 13.500 a 17.500 daltons.

Então, diante da impossibilidade de boa resolução através de métodos convencionais em colunas cromatográficas, recorremos a uma metodologia já comprovada para a separação das sub-unidades: a eletroforese em PAA-SDS. O sistema preparativo nos permitiu a separação rápida e segura de cerca de 20 mg de proteína de naturada, em cada operação. A única restrição a este sistema refere-se à recuperação das amostras por trituração do gel. Nessa fase há um aproveitamento ao redor de 60% do material separado, visto que o gel fragmentado retém grande quantidade de líquido. Por este motivo em nossas separações eletroforéticas somente foi possível recuperar uma quantidade satisfatória das bandas c e d, as quais se apresentaram unidas no setor circular corado com Coomassie.

A solução contendo as bandas c e d foi então passada por coluna de troca iônica para remoção de SDS. Mantida sob refrigeração a mesma apresentou, decorridos alguns dias, um precipitado, a exemplo das soluções do IA, após a retirada do SDS por troca iônica. Parece ter ocorrido uma aglutinação ao acaso das moléculas protéicas inicialmente solúveis e estáveis na forma destendida ("random coil"). A ressolubilização da proteína somente foi possível através da incorporação de SDS ou N-etilmorfolina ao meio.

5.7 - Aminoácidos Terminais

A migração das bandas eletroforéticas não nos trouxe prova definitiva do número de sub-unidades. Como já se referiram POWERS & WHITAKER⁽⁵²⁾ uma dúvida persistia com relação ao número total das cadeias protéicas que formam o inibidor de α -amilase, podendo ser consideradas em número de 3 a 5. Esta variação é devido às possibilidades das bandas c e d serem consideradas homogêneas, por outro lado a quinta banda estaria na contingência da banda a ser confirmada como sub-unidade.

Por esta razão julgamos ser necessário o emprego de um método que permitissem a estimativa do número real de sub-unidades. Para tanto, resolvemos determinar os aminoácidos terminais através da marcação com dansil-HCl.

A análise do produto da marcação foi executada inicialmente por eletroforese em papel, distinguindo-a apenas duas manchas fluorescentes, sob luz U.V. para a molécula não dissociada do IA. Das duas manchas apenas a alanina pôde ser confirmada através de comparação com padrões (Fig. 11).

Posteriormente, empregando placas de poliamida, estudamos o IA e finalmente as bandas c e d dissociados conjuntamente.

A alta resolução dessas placas permitiu, sob luz U.V., o acompanhamento da cromatografia após cada etapa de corrida de solvente. Em seguida à passagem dos dois primeiros solventes puderam ser distinguidas manchas correspondente a alanina e ao ácido glutâmico (Fig. 12), restando apenas a definição da terceira mancha que poderia ser treonina ou serina. O terceiro solvente confirmou a treonina, repetindo-se os mesmos terminais ao longo

de seis diferentes marcações e corridas com o IA total.

Confirmando, então, a presença de três aminoácidos N-terminais: alanina, ác. glutâmico e treonina. Em seguida, procuramos identificar os N terminais das bandas c e d pela mesma técnica, ficando evidenciada a presença de treonina e alanina, o que confirmou a existência de cadeias polipeptídicas distintas naquelas bandas. Por exclusão supomos ser a banda responsável pelo resíduo de ácido glutâmico.

Os aminoácidos N-terminais encontrados são comuns entre as proteínas de leguminosas. O ácido glutâmico aparece frequentemente⁽¹⁷⁾ ao lado de serina. Especialmente no P. vulgaris já foi relatada a existência de treonina, serina, leucina e ácido glutâmico⁽⁴⁾.

Outro teste indicativo do número de sub-unidades é a identificação do aminoácido C-terminal, que foi feito usando-se a carboxipeptidase A. A escolha de tal enzima se deve a sua ação sobre um grande número de resíduos de aminoácidos não liberando apenas prolina, arginina e hidroxiprolina⁽¹⁾.

A Figura 13 mostra a liberação de aminoácidos em função do tempo de reação. Há dois minutos do início do experimento a liberação de serina, tirosina e leucina já atinge 8,6, 10,8 e 11,5 n moles, ou seja em torno de 50% do total. Nota-se também que o teor de ácido aspártico mantém-se estável ao longo de todo experimento e que a alanina, após uma velocidade inicial de aparecimento lenta, atinge o máximo de liberação aos 30 min. Neste caso, paralelamente ao que acontece com a valina e alanina parece ser resultado de uma segunda etapa de hidrólise, indicando ser o segundo ou terceiro resíduo da cadeia.

Como a velocidade de liberação da serina é lenta em relação aos demais e do ácido aspártico é a mais lenta de todas, não se pode afirmar com total segurança que estes sejam os aminoácidos C-terminais. O ideal nessa situação seria a hidrólise de cada sub-unidade separadamente, podendo-se assim estabelecer sequência de aminoácidos a partir da carboxila terminal. De qualquer forma podemos assumir que ao menos tirosina e leucina sejam duas carboxilas terminais do IA, restando a dúvida em relação à serina, à alanina e ao ácido aspártico.

O estudo da estrutura de uma proteína que possui interação específica com outra é fundamental na interpretação dos mecanismos envolvidos na ligação entre ambas. Acreditamos que a exemplo do que aconteceu com o inibidor de tripsina^(60,83), o conhecimento da estrutura do IA deverá levar à compreensão do seu mecanismo de ação e, mais amplamente, à compreensão do mecanismo geral de interação proteína-proteína.

Neste trabalho acreditamos ter ampliado as informações existentes sobre o IA de feijão em vários níveis: a nível de estrutura primária, pela confirmação da composição em aminoácidos, identificação de aminoacúcares e dos aminoácidos C e N-terminais; a nível de estrutura secundária e terciária pelas definições do número de sub-unidades, da inexistência de pontes dissulfeto, do peso molecular, do ponto isoelétrico, além de resistência a proteólise e de propriedades de dissociação-reassociação.

6 - CONCLUSÕES

Com base nos dados encontrados foi possível concluir que:

- o inibidor de α -amilase de feijão é uma glicoproteína de 53.000 daltons de peso molecular, com ponto isoelétrico 4,35, composto por 400 resíduos de aminoácidos, sem ponte dissulfeto na estrutura;
- a molécula do inibidor de α -amilase é formada por três sub-unidades distintas, que se dissociam na presença de SDS e guanidina, tendo treonina, alanina e ácido glutâmico como o aminoácidos N-terminais, além de leucina e tirosina com C-terminais;
- o inibidor de α -amilase na sua forma nativa é resistente à ação de tripsina, quimotripsina, pancreática e protease fúngica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - AMBLER, R.P. Enzymatic hydrolysis with carboxypeptidases .
Meth. Enzymol., New York, 25:143-54, 1972.
- 2 - ANDREWS, P. Estimation of the molecular wights of proteins
by Sephadex gel-filtration. Biochem. J., London, 91:222-
33, 1964.
- 3 - ASCHAUER, H.; VÉRTESY, L.; BRAUNITZER, G. Die Sequenz des
 α -Amylaseinhibitors Hoe-467A (α -Amylaseinaktivator HOE-
467A) aus Streptomyces tendae 4158. Hoppe-Seyler's Z.
Physiol. Chem., Berlin, 362:465-467, 1981.
- 4 - BARKER, R.D.J.; DERBYSHIRE, E.; YARWOOD, A.; BOULTER, D.
Purification and characterization of the major storage
proteins of intracellular and cotyledonary distribution.
Phytochemistry, Oxford, 15:751-57, 1976.
- 5 - BELEW, M. & FOHLMAN, J. Gel filtration of proteins on
Sephacryl S-200 superfine in 6 M guanidine-HCl. FEBS
Lett., Amsterdam, 91:302-304, 1978.
- 6 - BERNFELD, P. Amylase α and β . Meth. Enzymol., New York,
1:149-54, 1955.
- 7 - BLANCO-LABRA, A. & ITURBE-CHÍNAS, F.A. Purification and
characterization of an α -amylase inhibitor from maíse
(Zea maize). J. Food Biochem., Westport, 5:1-17, 1981.

- 8 - BO-LINN, G.W.; SANTA ANA, C.A.; MORAWSKI, S.G.; FORDTAAN, J. S. Starch blockers - their effect on calorie absorption from a high-starch meal. N. Engl. J. Med., Boston, 307: 1413-6, 1982.
- 9 - BOWMAN, D.E. Amylase inhibitor in navy beans. Science, Washington, 102:2649-50, 1945.
- 10 - BUONOCORE, V.; GRAMENZI, F.; PACE, W.; PETRUCCI, T.; POERIO, E.; SILANO, V. Interaction of wheat monomeric and dimeric protein inhibitors with α -amylase from yellow mealworm (Tenebrio molitor L.) larva . Biochem. J., London, 187: 637-45, 1980.
- 11 - BURGERSS, R.R. Separation and characterization of the subunits of ribonucleic acid polimerase. J. biol. Chem., Baltimore, 244:6168-76; 1969.
- 12 - CHANBRASEKHER, G.; RAJU, D.S.; PATTABIRAMAN, T.N. Natural plant enzyme inhibitors. α -Amylase inhibitors in Millets. J. Sci. Food Agric., London, 32:9-16, 1981.
- 13 - DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II - Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., New York, 121:404-427, 1964.
- 14 - DAVIS, G.E. & STARK, G.R. Use of dimetil suberimide, a cross-linking reagent, in studying the subunit structure of oligomeric proteins. Proc. Nac. Acad. Sci. U.S.A., Washington, 66:651-6, 1970.
- 15 - DAVISON, P.F. Protein in denaturing solvents: gel exclusion studies. Science, Washington, 150:906-7, 1968.
- 16 - DEPONTE, R.; PARLAMENTI, R.; PETRUCCI, T.; SILANO, V.; TOMASI, M. Albumin α -amylase inhibitor families from wheat flour. Cereal Chem., St.Paul, 53:805-20, 1976.

- 17 - DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D.J.; BOULTER, D. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. Phytochemistry, Oxford, 15:3-24, 1976.
- 18 - DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; SMITH, F. Colorimetric method of determination of sugar and related substance. Anal. Chem., Easton, 28:350-6, 1956.
- 19 - FINARDI FILHO, F. & LAJOLO, F.M. Identificação eletroforética de inibidor de α -amilase em geis de poliacrilamida-amilopectina. Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas, 2: 21-32, 1982.
- 20 - FISH, W.W.; MANN, K.G.; TANFORD, C. The estimation of polipeptide chain molecular weights by gel filtration in 6 M guanidine hydrochloride. J. biol. Chem., Baltimore, 244:4989-94, 1969.
- 21 - FROMMER, W.; JUNGE, B.; MÜLLER, L.; SCHMIDT, D.; TRUSCHEIT, E. Neue Enzyminhibitoren aus Mikroorganismen. Planta Med., Stuttgart, 35:195-217; 1979.
- 22 - FUKUHARA, K.; MURAI, H.; MURAO, S. Isolation and structure-activity relationship of some amylostatins (F-1b Fraction) produced by Streptomyces diastaticus subsp. Amylostaticus N^o 9410. Agric. Biol. Chem., Tokyo, 46: 1941-5; 1982.
- 23 - FUKUHARA, K.; MURAI, H.; MURAO, S. Amylostatins, other amylase inhibitors produced by Streptomyces diastaticus subsp. Amylostaticus N^o 2476. Agric. Biol. Chem., Tokyo, 46:2021-30, 1982.
- 24 - GRANUM, P.E. Purification and characterization of an α -amylase inhibitor from rye (Secale cereale) flour. J. Food Biochem., Westport, 2:103-20, 1978.

- 25 - GRANUM, P.E. & ESKELAND, B. Nutritional significance of α -amylase inhibitor from wheat. Nutr. Rep. Inter., Los Altos, 23:155-62, 1981.
- 26 - GRANUM, P.E. & WHITAKER, J.R. Purification and characterization of α -amylase inhibitor in wheat (*Tritium aestivum* var. Anza). J. Food Biochem., Westport, 1:385-401, 1977.
- 27 - GRAY, W.R. End-group analysis using dansil chloride. Meth. Enzymol., New York, 25:121-38, 1972.
- 28 - HEMBERG, T. & LARSSON, I. The inhibitor β complex from resting potato tubers as an inhibitor of α -amylase. Physiol. Plant., Copenhagen, 14:861-7, 1961.
- 29 - HO, R.S.; ARANDA, C.G.; VERRICO, J.A. Species differences in response to two natural occurring α -amylase inhibitors. J. Pharm. Pharmacol., London, 33:551, 1981.
- 30 - IRSHAD, M. & SHARMA, C.B. Purification and properties of an α -amylase protein-inhibitor from *Arachis hypogaea* seeds. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 659:326-33, 1981.
- 31 - ITOH, J.; OMOTO, S.; SHOMURA, T.; OGINO, H.; IWAMATSU, K.; INOUE, S.; HIDAKA, H. Oligostatins, new antibiotics with inhibitory activity. I. Production, isolation and characterization. J. Antibiot., Tokyo, 34:1424-8, 1981.
- 32 - JAFFE, W.G. & KORTE, R. Nutritional characteristics of the winged bean in rats. Nutr. Rep. Inter., Los Altos, 14:449-55, 1976.
- 33 - KLUH, I. Amino acid sequence of hog pancreatic α -amylase isoenzyme I. FEBS Lett., Amsterdam, 136:231-4, 1981.

- 34 - LAJOLO, F.M. Inibidor de amilase do Phaseolus vulgaris: estudo bromatológico. São Paulo, 133 p., 1977 |Tese de livre-docência - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Univ. São Paulo|.
- 35 - LENARD, J. Rapid and effective removal of sodium dodecyl sulfate from proteins. Biochem. Biophys. Res. Com. , New York, 45:662-8, 1971.
- 36 - LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. - Protein measurement with the folin phenol reagent. J. biol. Chem., Baltimore, 193:265-75, 1951.
- 37 - MANCINI FILHO, J. & LAJOLO, F.M. Fatores antinutricionais em diferentes variedades de feijões (Phaseolus vulgaris L.). Cienc. Cult., São Paulo, 33:94-97, 1981.
- 38 - MARSHALL, J.J. & LAUDA, C.M. Purification and properties of Phaseolamin, as inhibitor of α -amylase, from the kidney bean, Phaseolus vulgaris. J. biol. Chem., Baltimore , 250:8030-7, 1975.
- 39 - MOORE, S. On the determination of cystine as cysteic acid. J. biol. Chem., Baltimore, 238:235-7, 1963.
- 40 - MURAO, S. & OHYAMA, K. Chemical structure of an amylase inhibitor, S-AI. Agric. Biol. Chem., Tokyo, 43:679-81, 1979.
- 41 - MURAO, S.; OOUCHI, N.; GOTO, A.; ARAI, M. New proteinaceous α -amylase inhibitor (Paim) from Streptomyces corchorusii. Agric. Biol. Chem., Tokyo, 47:453-4, 1983.
- 42 - NAKANO, H.; TAJIRI, T.; KOBAYASHI, Y.; UEDA, S. Some properties of amylase inhibitor A produced by Streptomyces sp. Nº 280. Agric. Biol. Chem., Tokyo, 45:1053-60, 1981.

- 43 - KASHLAN, N. & RICHARDSON, M. The complete amino acid sequence of a major wheat protein inhibitor of α -amylase. Phytochemistry, Oxford, 20:1781-4, 1981.

- 44 - O'CONNOR, C.M. & McGEENEY, K.F. Isolation and characterization of four inhibitors from wheat flour which display differential inhibition specificities for human salivary and human pancreatic α -amylase. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 658:387-96, 1981.

- 45 - O'CONNOR, C.M. & McGEENEY, K.F. Interaction of human α -amylase with inhibitors from wheat flour. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 658:397-405, 1981.

- 46 - ODANIS, S.; KOIDE, T.; ONO, T. Sequence homology between barley trypsin inhibitor and wheat α -amylase inhibitors. FEBS Lett., Amsterdam, 141:279-282; 1982.

- 47 - OMOTO, S.; ITOH, J.; OGINO, H.; IWAMATSU, K.; NISHIZAWA, N.; INOUE, S. Oligostatins, new antibiotics with amylase inhibitory activity. II. Structures of oligostatins C, D and E. J. Antibiot., Tokyo, 34:1429-44, 1981.

- 48 - PETRUCCI, T.; SANNIA, G.; PARLAMENTI, R.; SILANO, V. Structural studies of wheat monomeric and dimeric protein inhibitors of α -amylase. Biochem. J., London, 173:229-35, 1978.

- 49 - PETRUCCI, T.; TOMASI, M.; CANTAGALLI, P.; SILANO, V. Comparison of wheat albumin inhibitors of α -amylase and trypsin. Phytochemistry, Oxford, 13:2487-95, 1974.

- 50 - PICK, K.-H. & WÖBER, G. Proteinaceous α -amylase inhibitor from beans (Phaseolus vulgaris). Purification and partial characterization. Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem., Berlin, 359:1371-77, 1978.

- 51 - PICK, K.-H. & WÖBER, G. Proteinaceous α -amylase inhibitor from beans (Phaseolus vulgaris). Immunological characterization. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., Berlin, 359:1379-1384, 1979.
- 52 - POWERS, J.R. & WHITAKER, J.R. Purification and some physical and chemical properties of red kidney bean (Phaseolus vulgaris) α -amylase inhibitor. J. Food Biochem., Westport, 1:217-38, 1977.
- 53 - POWERS, J.R. & WHITAKER, J.R. Effect of several experimental parameters on combination of red kidney bean (Phaseolus vulgaris) α -amylase inhibitor with porcine pancreatic α -amylase. J. Food Biochem., Westport, 1:239-60, 1977.
- 54 - POWERS, J.R. & CULBERTSON, J.D. In vitro effect of bean amylase inhibitor on insect amylases. J. Food Prot., Ames, 45:655-7, 1982.
- 55 - PRESSEY, R. Natural enzyme inhibitors in plant tissues. J. Food Sci., Chicago, 37:521-3, 1972.
- 56 - PULS, W.; KEUP, U.; KRAUSE, H.P.; THOMAS, G.; HOFFMEISTER, F. Glucosidase inhibition. A new approach to the treatment of diabetes, obesity, and hyperlipoproteinaemia. Naturwissenschaften, Berlin, 64:536-7, 1977.
- 57 - REDDY, N.R. & SALUNKHE, D.K. Alpha-amylase inhibitor and phytohemagglutinins of black gram (Phaseolus mungus L.) J. Food Biochem., Westport, 4:273-276, 1980.
- 58 - REISFIELD, R.A.; LEWIS, V.I.; WILLIAMS, D.E. Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. Nature, London, 195:281-3, 1963.
- 59 - RICHARDSON, M. The proteinase inhibitors of plant and micro-organisms. Phytochemistry, Oxford, 16:159-69, 1977.

- 60 - RICHARDSON, M. Protein inhibitors of enzyme. Food Chem., Barking, 6:235-53, 1980-81.
- 61 - SAITO, N. α -Amylase inhibitor from fungus Cladosporium herbarum F-828. J. biol. Chem., Baltimore, 257:3120-5, 1982.
- 62 - SAMPAIO, C.A.M. & PRADO, E.S. Action of proteolytic enzymes upon horse urinary kallikrein. Biochem. Pharmacol., Oxford, 24:1438-9, 1975.
- 63 - SAVAIANO, D.A.; POWERS, J.R.; COSTELLO, M.J.; WHITAKER, J. R.; CLIFFORD, A.J. The effect of an α -amylase inhibitor on the growth rate of weanling rats. Nutr. Rep. Inter., Los Altos, 15:443-9, 1977.
- 64 - SCHMIDT, D.D.; FROMMER, W.; JUNGE, B.; MÜLLER, L.; WINGEN - DER, W.; TRUSCHEIT, E.; SCHÄFER, D. α -Glucosidase Inhibitors. New Complex oligosaccharides of microbial origin. Naturwissenschaften, Berlin, 64:535-6; 1977.
- 65 - SEGREST, J.P. & JACKSON, R.L. Molecular weight determination of glucoprotein by PAGE in SDS. Meth. Enzymol., New York, 28:54-63, 1972.
- 66 - SHAIKIN, R. & BIRK, Y. α -Amylase inhibitors from wheat isolation and characterization. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 221:502-13, 1970.
- 67 - SHARMA, K.K. & PATTABIRAMAN, T.N. Natural plant enzyme inhibitors. Isolation and Characterization of two α -amylase inhibitors from Colocasia antiquorum tubers. J. Sci. Food Agric., London, 31:981-91, 1980.

- 68 - SHARMA, K.K. & PATTABIRAMAN, T.N. Natural plant enzyme inhibitors. Purification and properties of an amylase inhibitor from yam (Dioscorea alata). J. Sci. Food Agric., London, 33:255-262, 1982.
- 69 - SHIVARAJ, B. & PATTABIRAMAN, T.N. Natural plant enzyme inhibitors: Part-IV - α -amylase inhibitors in plant seeds. Arogya, Manipal, 2:131-5, 1976.
- 70 - SHIVARAJ, B. & PATTABIRAMAN, T.N. Natural plant enzyme inhibitor: Part VIII - Purification & properties of two α -amylase inhibitors from Ragi (Eleusine coracana) grains. Indian J. Biochem. Biophys. New Delhi, 17:181-5, 1980.
- 71 - SHIVARAJ, B. & PATTABIRAMAN, T.N. Natural plant enzyme inhibitors. Characterization of an unusual α -amylase/trypsin inhibitor from Ragi (Eleusine coracana Gaertn.). Biochem. J., London, 193:29-36, 1981.
- 72 - SHIVARAJ, B.; SHARMA, K.K.; PATTABIRAMAN, T.N. Natural plant enzyme inhibitors: Part VII - Alpha amylase inhibitors & amylases in plant tubers. Indian J. Biochem. Biophys., New Delhi, 16:52-5, 1979.
- 73 - SHUSTER, L. Preparative acrylamide gel electrophoresis continuous and disc techniques. Meth. Enzymol., New York, 22:412, 1971.
- 74 - SILANO, V. Biochemical and nutritional significance of wheat albumin inhibitors of α -amylase. Cereal Chem., St.Paul, 55:222-31, 1978.
- 75 - SILANO, V.; FURIA, M.; GIANFREDA, L.; MACRI, A.; PALESCANDO LO, R.; RAB, A.; SCARDI, V.; STELLA, E.; VALFRE, F. Inhibition of amylase from different origins by albumins from the wheat kernel. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 391:170-8, 1975.

- 76 - SILANO, V.; POCCHIARI, F.; KASARDA, D.D. Physical characterization of α -amylase inhibitors from wheat. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 317:139-48, 1973.
- 77 - SINGH, U.; KHERDEKAR, M.S.; JAMBUNATHAN, R. - Studies on Desi and Kabuli chickpea (Cicer arietinum L.) cultivars. The levels of amylase inhibitors, level of oligosaccharides and in vitro starch digestibility. J. Food Sci., Chicago, 47:510-2, 1982.
- 78 - SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino acids. Anal. Chem., Washington, 30:1190-206, 1958.
- 79 - SPIRO, R.G. Glycoproteins. Adv. Prot. Chem., New York, 27:349-467, 1973.
- 80 - SUMATHI, S. & PATTABIRAMAN, T.N. Natural plant enzyme inhibitors. VI. Studies on trypsin inhibitors of Colocasia antiquorum tubers. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 566:115-27, 1979.
- 81 - TANFORD, C. Protein Denaturation. Adv. Prot. Chem., New York, 23:121-282, 1968.
- 82 - TANIZAKI, M.M. Interação de amilase pancreática com inibidor específico isolado de Phaseolus vulgaris. São Paulo, 88 p., 1982. |Tese de doutoramento - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Univ. São Paulo|.
- 83 - TOWNSHEND, G.S.; BOTES, D.P.; VISSER, L. Properties of fragments prepared from Bowman-Birk inhibitors. Biochim. Biophys Acta, Amsterdam, 701:346-356, 1982.

- 84 - WEBER, K. & OSBORN, M. The reliability of molecular weight determination by docedyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. biol. Chem., Baltimore, 244:4406-12, 1969.
- 85 - WRIGLEY, C. M. Gel electrofocusing. Meth. Enzymol., New York, 22:559-64, 1971.
- 86 - YETTER, M.A.; SAUNDERS, R.M.; BOLES, H.P. α -Amylase inhibitors from wheat kernels as factor in resistance to postharvest insects. Cereal Chem., St. Paul, 56:243-4, 1979.

SUMMARY

The α -amylase inhibitor from Phaseolus vulgaris is a glucoprotein with a Molecular Weight of 53,000 daltons and an isoelectric point of 4.35. It can be dissociated by SDS or guanidin in three subunits having molecular weight of 17,500, 16,000 and 13,500. The molecule has 400 amino acid residues and no disulfide bridge. The C and N terminal amino acid are respectively: leucine and tyrosine, and threonine, alanine, and glutamic acid. It is resistant to proteolysis in the native state.

ABREVIATURAS

A	-	absorbância
ala	-	alanina
Dansil-HCl	-	1-dimetilaminonaftaleno-5-sulfocloreto
DEAE-celulose	-	dietilaminoetil-celulose
DMS	-	dimetilsuberimidato
glu	-	ácido glutâmico
gly	-	glicina
IA	-	inibidor de α -amilase
leu	-	leucina
PAA	-	poliacrilamida
PI	-	ponto isoelétrico
PM	-	peso molecular
pro	-	prolina
SDS	-	dodecilsulfato de sódio
ser	-	serina
thr	-	treonina
Tris	-	tris(hidroxi metil)aminometano
tyr	-	tirosina
val	-	valina
Vo	-	volume de exclusão