**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Curso de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos

**Estrutura Molecular Comparativa dos
Isoinibidores de α -Amilase do Feijão
(*Phaseolus vulgaris*)**

FLAVIO FINARDI FILHO

Tese para obtenção do título de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. FRANCO M. LAJOLO

São Paulo

1990

12551

AGRADECIMENTOS

Antes de iniciarmos a apresentação deste trabalho, gostaríamos de expressar nossos agradecimentos às pessoas e instituições que tiveram participação ativa na sua elaboração:

Inicialmente e com o maior prazer, ao Prof. Franco M. Lajolo pela permanente orientação que sempre modulou nossa conduta científica.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental pela confiança que nos depositou desde o início de nossa vida acadêmica.

Ao Prof. John R. Whitaker, da University of California em Davis, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e aprender seu modo de vida, com muito trabalho, perseverança e entusiasmo.

À Prof^a S. Susanne Nielsen, da Purdue University, pela prestativa análise da seqüência de amino ácidos.

À FINEP, à OEA e ao CNPq pelo financiamento de equipamentos, insumos, viagens e bolsa de pesquisa.

Ao Instituto de Química e ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas pelos equipamentos utilizados.

Às colegas Beatriz e Elisabeth pelos comentários e reflexões sempre oportunos e perspicazes.

Aos colegas de laboratório, Antonia, Chao, Dalva, Elza, Frank, Inés, Rosália, Simone e Xiaoye, que muito contribuíram na discussão e aplicação de técnicas, bem como nas interpretações preliminares dos resultados.

A Márcia pelo respeito ao eterno caos de nossa bancada de laboratório.

A Benê e Cláudia pela colaboração nas áreas de suas especialidades.

Defendida em: 03/04/91

UM AGRADECIMENTO

ESPECIAL A ELLEN:

MAIS DO QUE NUNCA,

MINHA COMPANHEIRA.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Inibidores de α -Amilase de Cereais	5
2.2. Inibidores de α -Amilase de Leguminosas	8
2.3. Inibidores de α -Amilase de Microorganismos	11
2.4. Inibidores de α -Amilase de Tubérculos e Frutos	12
2.5. Aspectos Nutricionais	13
2.6. Estrutura dos Inibidores de α -Amilase	15
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1. Materiais	19
4.1.1. Feijão	19
4.1.2. Reagentes	19
4.1.3. Meios de Separação e Cromatográficos	19
4.1.4. Proteínas e Enzimas	20
4.2. Métodos	20
4.2.1. Isolamento e Purificação	20
4.2.2. Determinação de Proteínas	22
4.2.3. Determinação de Carboidratos	22
4.2.4. Eletroforese	23
4.2.5. Focalização Isoelétrica	23
4.2.6. Determinação de Atividade dos Inibidores de α -Amilase	24
4.2.7. Peso Molecular	24
4.2.8. Determinação da Hidrofobicidade Superficial	24
4.2.9. Análise de Amino Ácidos	25
4.2.10. Hidrólise Trípica	25
4.2.11. Separação das Sub-Unidades	25
4.2.12. Emissão de Fluorescência	26
4.2.13. Calorimetria Diferencial	26
4.2.14. Seqüenciamento de Amino Ácidos	26

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1. Purificação	27
5.1.1. Extração e Fracionamento	27
5.1.2. Cromatografia em DEAE-Celulose	29
5.1.3. Cromatografia de Interação Hidrofóbica	29
5.1.4. Cromatografia em Sephadex G-100	33
5.2. Características Química	33
5.2.1. Carboidratos	37
5.2.2. Peso Molecular	37
5.2.3. Ponto Isoelétrico	40
5.2.4. Composição de Amino Ácidos	45
5.2.5. Hidrofobicidade Superficial	45
5.2.6. Mapas Trípticos	48
5.3. Condições de Dissociação Molecular	51
5.3.1. Agentes Químicos e Temperatura	51
5.3.2. Denaturação Térmica	54
5.3.3. Pesos Moleculares das Sub-Unidades	57
5.3.4. Mudanças Conformacionais em Condições Dissociantes	57
5.3.5. Reversibilidade das Proteínas Dissociadas	58
5.4. Separação das Sub-Unidades	63
5.5. Caracterização das Sub-Unidades	67
6. CONCLUSÕES	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
8. RESUMO	90
9. ABSTRACT	91
10. LISTA DE TABELAS	92
11. LISTA DE FIGURAS	93
12. LISTA DE ABREVIATURAS	95
13. LISTA DE ABREVIATURAS DE AMINO ÁCIDOS	97

1.INTRODUÇÃO

A cultura de feijão, para a alimentação humana, não tem sua origem precisamente determinada. Há relatos de consumo de feijões e favas nos países do Mediterrâneo desde a antigüidade, especialmente em Roma e no Egito. Outras citações também são encontradas na Ásia e na África Ocidental. Em todas elas, porém, as características descritas apontam para diferentes espécies dos gêneros *Phaseolus*, *Cajanus* e *Dolichos*. No entanto, o feijão comum, *Phaseolus vulgaris*, só foi conhecido e difundido após o descobrimento da América (SMARTT e HYMOWITZ, 1985). Apontado por alguns autores como originário da América do Sul, o feijão comum era conhecido pelos nativos no século XVI, mas não fazia parte do cardápio indígena na época (CASCUCO, 1983).

A variedade Aborígine, inicialmente denominada *Phaseolus aborigineus*, encontrada no norte da Argentina, é considerada como o ancestral selvagem do *P. vulgaris* (BERGLUND-BRÜCHER e BRÜCHER, 1976). A domesticação de *P. vulgaris* e de *P. lunatus* ocorreu em toda América (SMARTT e HYMOWITZ, 1985). Exemplos da dispersão de feijões no Novo Mundo foram dados por KAPLAN (1965), que mapeou sítios arqueológicos, no México, nos Estados Unidos, na América Central e no Peru, onde foram encontradas amostras de quatro espécies do gênero *Phaseolus*. A mais antiga delas se referia à região Asteca de Tularosa, a 7.000 anos atrás. Porém, o registro mais antigo de cultura de *P. vulgaris* e de *P. lunatus* foi dado anos mais tarde por KAPLAN et al. (1973), através da datação com ^{14}C de sementes encontradas na caverna Guitarrero, em Callejón de Huaylas, no Peru. Pelas amostras, os autores concluíram que as espécies eram cultivadas entre 8.500 e 5.500 a.C.

Mas, foi na América do Sul, especialmente no Brasil colonial, com a chegada dos africanos, que iniciou-se o plantio de feijão para alimentação dos escravos. Rapidamente seu uso foi difundido entre toda população. Segundo CASCUDO (1983), "o brasileiro, filho de portugueses, ameríndios e africanos foi o consumidor-propagandista do feijão. Os pais tiveram uso

intermitente e acidental, valorizado, ampliado, e enobrecido no nível de costume pelo filho".

Hoje, o plantio do feijão está disseminado por inúmeros países, mas os maiores produtores são Índia e Brasil, que respondem por 41,4% da produção mundial (FAO, 1988). Apesar de constar em segundo lugar, a produção brasileira concentra-se nas variedades de *P. vulgaris*, tornando o país o maior produtor desta espécie. Toda a produção, no entanto, é consumida internamente, atingindo-se a média de 20 Kg/ano/pessoa.

Ainda pelos dados estatísticos de produção (IBGE, 1987) nota-se que a produtividade média no Brasil situa-se abaixo de 500 Kg/ha, demonstrando ser uma cultura de subsistência. Apenas algumas regiões produtoras do Paraná atingem 3.000 Kg/ha, e poucos são os produtores que colhem até 3.250 Kg/ha, graças às técnicas modernas de irrigação e colheita mecanizada.

Deve-se ressaltar, também, o grande número de variedades de feijão comum, resultado da busca de melhor produção e adaptação climática. Somente a título de exemplo, até 1982 estavam catalogadas 28.542 variedades cultivadas de *P. vulgaris*, no banco de sementes do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Colômbia.

O CIAT recebe amostras de todo mundo, bem como desenvolve pesquisas de técnicas agrícolas e melhoramento genético em várias espécies de feijão, com objetivos de melhorar a qualidade e aumentar o rendimento das culturas. Para tanto, é necessário aumentar a resistência às doenças e ao ataque de insetos (OSBORN et al. 1988), adaptar as variedades a novos habitats e reduzir ou eliminar substâncias tóxicas (ADAMS et al. 1985). Além de aumentar a produção nas áreas cultivadas, os resultados das pesquisas agrícolas têm permitido estender o plantio a novas frentes, aumentar o período de armazenamento de sementes destinadas ao consumo, bem como melhorar os aspectos nutricionais do feijão (SUMMERFIELD e ROBERTS, 1985).

No campo da nutrição, inúmeros estudos têm sido realizados visando as populações carentes da América Latina e da África, principalmente. Hoje, os estudos nutricionais com feijão têm tomado

rumos diversos, além dos tradicionais ensaios para avaliação protéico-calórica. A biodisponibilidade de nutrientes e minerais (GARCIA-LOPEZ et al. 1990), a digestibilidade das frações protéicas (LANFER-MARQUEZ e LAJOLO, 1990), a interação dos taninos com componentes da dieta (BUTLER, 1989), a função fisiológica da fração fibra (LAJOLO et al. 1988), o papel das lectinas (LIENER, 1989) e dos inibidores enzimáticos (GALLAHER e SCHNEEMAN, 1986) são alguns dos exemplos de tópicos importantes nas pesquisas da bioquímica ligada à nutrição.

Em nosso laboratório temos dado destaque ao estudo detalhado das lectinas e dos inibidores de α -amilase. Nessas linhas temos abordado aspectos bioquímicos, fisiológicos e nutricionais, dentro de um amplo plano sobre o feijão, que envolve também a digestibilidade de frações protéicas e do amido, o efeito dos compostos fenólicos e o endurecimento de sementes.

Passaremos a relatar a seguir os aspectos mais relevantes dos inibidores de α -amilase, incluindo-se dados relativos aos inibidores obtidos de outras espécies vegetais e de microorganismos, seus mecanismos de ação e estruturas químicas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Além dos feijões, inibidores de α -amilase (IA) tem sido descritos especialmente em cereais e microorganismos (WHITAKER, 1989). Com menor frequência, também são encontradas citações de IAs em tubérculos, como cará e inhame (SHARMA e PATTABIRAMAN, 1980 e 1982), em frutos, na manga (MATTOO e MODI, 1970) e na bolota (STANKOVIC e MARKOVIC, 1960-61) e em amendoim (IRSHAD e SHARMA, 1981).

Entre os cereais, o trigo figura como a principal fonte de IAs devido às múltiplas formas apresentadas (BUONOCORE e SILANO, 1986; GARCIA-OLMEDO et al. 1987; WHITAKER, 1989). Outros cereais, como cevada, milheto indiano, centeio, sorgo, tritcale e milho, também os apresentam (WHITAKER, 1989).

CHZASZCS e JANICKI (1933 e 1934) descreveram pela primeira vez a existência de inibidores de α -amilase, em trigo. Os autores não os identificaram como proteínas, denominando-os de substâncias "sistoamilásicas". Alguns anos mais tarde KNEEN e SANDSTEDT (1943 e 1946), também trabalhando com trigo, concluíram que os inibidores eram proteínas hidrossolúveis. Ainda na mesma época, BOWMAN (1945) descreve o inibidor em feijão. Porém, somente a partir dos trabalhos de SAUNDERS e LANG (1973), SILANO et al. (1973) e MARSHALL e LAUDA (1975b) a purificação e a caracterização dos IAs tiveram importantes progressos.

GARCIA-OLMEDO e colaboradores (1987), em extensa revisão sobre os inibidores de proteases e de α -amilase, propõem a inclusão dos IAs em dois dos sete grupos sugeridos. No grupo 1 foram colocados os inibidores bifuncionais, compreendendo os inibidores endógenos de α -amilase e de serinoproteases. No grupo 3 estão classificados os inibidores exógenos de tripsina ou de α -amilase, onde se encontram os inibidores do trigo, da cevada, do milheto e do feijão. Porém, esta classificação não tem sido seguida, pois não abrange todos inibidores conhecidos. A forma de classificação que é mais aceita, atualmente, divide

os inibidores segundo as fontes de obtenção, com subdivisões relativas às características funcionais.

2.1. Inibidores de α -Amilase de Cereais

O trigo diplóide, *Triticum aestivum*, não apresenta inibidor de α -amilase (BEDETTI et al. 1974). Entretanto, o trigo tetra e hexaplóides contém pelo menos sete formas poliméricas distintas, que podem ser divididas em famílias de inibidores. VITTOZZI e SILANO (1976), trabalhando com a variedade Mentana, propuseram a existência de quatro famílias de inibidores, com pesos moleculares de 60.000, 44.000, 24.000 e 12.000 Daltons. Porém, dependendo do tratamento empregado, há transformações intermoleculares tendo como base o monômero de 12.000 (DePONTE et al. 1976).

Dos IAs do trigo, as formas mais estudadas são a 0,19 e a 0,53, assim denominadas devido à migração eletroforética. Ambas, com peso molecular de 24.000, são compostas por duas moléculas de inibidor 0,28, de 12.000 Daltons (DePONTE et al. 1976). Além dessas, há também uma forma tetramérica, com peso molecular de 63.000, segundo O'CONNOR e McGEENEY (1981), ou de 48.000 Daltons, segundo BUONOCORE e colaboradores (1985).

A ação dos IAs do trigo tem sido descrita frente a enzimas exógenas de diversas fontes (SILANO et al. 1975). Embora inibam enzimas de aves, mamíferos e animais marinhos, os IAs de trigo possuem maior especificidade por α -amilase de insetos. A fração de 60.000 Daltons é a mais específica na inibição de amilases de 7 entre as 17 espécies de insetos ensaiadas. Por este motivo, a α -amilase de larvas de *Tenebrio molitor*, inseto que se alimenta de trigo, tem sido empregada nos ensaios de atividade (DePONTE et al. 1976).

Na tentativa de se encontrar o papel fisiológico dos IAs nos vegetais, duas hipóteses principais foram aventadas. A primeira seria considerá-los fatores de resistência ao ataque de insetos. A outra de serem reguladores metabólicos das α -amilases endógenas durante a germinação.

A primeira hipótese não teve ainda uma confirmação. Embora seja grande o número de relatos de inibição de amilases de insetos, eles se referem apenas a ensaios *in vitro*, não parecendo haver correlação com a reprodução e o desenvolvimento das mesmas espécies de insetos. Neste sentido, há um trabalho sobre a influência dos IAs de trigo no desenvolvimento de larvas de *Sitophilus oryzae* relacionado com a atividade *in vitro*. No entanto os dados mostraram-se inconclusivos (YETTER et al. 1979).

O papel de regulador metabólico ganhou interesse a partir do relato do primeiro inibidor endógeno de α -amilase, isolado do milho (BLANCO-LABRA e ITURBE-CHINAS, 1981). A principal característica desse inibidor é a de ter ação exclusiva sobre a α -amilase do milho, sendo inativo frente às enzimas de mamíferos.

Com as buscas de novas fontes de IAs, começaram a surgir os primeiros relatos de inibidores bifuncionais de α -amilase/protease. Um inibidor do trigo denominado WASI e outro BASI da cevada (*Hordeum vulgare*), com pesos moleculares de 20.500 e 21.000, respectivamente, atuam sobre as α -amilases endógenas, bem como sobre a subtilisina (MUNDY et al. 1983 e 1984). Cada um destes inibidores age sobre as amilases da outra espécie, e ambos sobre as enzimas de centeio e de aveia (MUNDY et al. 1984). Porém, ao contrário dos demais inibidores do trigo, estes não tem atividade frente as α -amilases de *T. molitor*, pancreática de porco e salivar humana.

A descoberta de inibidores endógenos de α -amilase além de gerar novas investigações sobre seu papel fisiológico, também estimulou a busca de aplicações práticas. Por exemplo, ABDUL-HUSSAIN e PAULSEN (1989) tentaram relacionar a resistência de certas variedades de trigo à germinação pré-colheita com os IAs, mas os resultados não confirmaram a hipótese inicial. Enquanto isso, ZAWISTOWSKA e col. (1987) de início patentearam um processo de purificação do IA de cevada, e em seguida propuseram seu emprego em farinha de trigo germinado, como melhorador de massa em panificação (ZAWISTOWSKA et al. 1988). Os autores demonstraram ser possível diminuir as perdas de safra, aproveitando o trigo maltado por influência de chuvas durante a colheita.

Assim como os IAs de cevada, o milheto indiano, conhecido como *ragi*, *Eleusine coracana*, também apresenta um inibidor bifuncional (SHIVARAJ e PATTABIRAMAN, 1981). O milheto contém duas frações ativas contra α -amilase, sendo que apenas uma delas inibe a tripsina.

Nos poucos trabalhos publicados sobre os IAs de centeio, *Secale cereale*, há divergências quanto ao número de frações ativas. DOJCZEW et al. (1986) descrevem a purificação parcial de duas frações, enquanto GRANUM (1978) purificou apenas uma proteína com atividade antiamilásica. O mesmo ocorreu com o sorgo, *Sorghum bicolor*, descrito a princípio com um único IA (KUTTY e PATTABIRAMAN, 1986) porém, recentemente, BLOCK JR. e RICHARDSON (1990) comunicaram o isolamento e o seqüenciamento de cinco IAs.

A presença de inibidores de α -amilase em tritcale (*Triticum x Secale*), híbrido do trigo e centeio, foi primeiramente detectada em sistema eletroforético desenvolvido em nosso laboratório (FINARDI FILHO e LAJOLO, 1982). Posteriormente identificamos e purificamos pelo menos seis frações ativas contra α -amilases salivar e pancreática (ROMANELLI et al. 1988; IDA, 1988). Um outro registro de IAs de tritcale relata a purificação de dois iso-inibidores bifuncionais, α -amilase/subtilisina, com características semelhantes às do trigo e da cevada (ZAWISTOWSKA et al. 1989).

Finalmente entre os cereais, o *Coix lacrima-jobi*, conhecido vulgarmente como lágrimas de Jó, apresenta um inibidor de α -amilase específico contra enzimas de insetos, inativo contra enzimas de saliva humana, pâncreas de porco, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae*, e malte de cevada (ARY et al, 1989). Além de isolarem e caracterizarem o IA, os autores seqüenciaram quase a metade da proteína. Os peptídeos seqüenciados foram comparados em banco de dados revelando grande homologia com endoquitinases. Posteriormente, o mesmo IA apresentou atividade quitinásica, sugerindo uma possível função protetora ao ataque de insetos.

2.2. Inibidores de α -Amilase de Leguminosas

O feijão é a segunda maior fonte de inibidor dentro de uma única espécie. Desde o trabalho pioneiro de BOWMAN (1945), com feijão branco, os relatos dos IAs têm sido sempre em variedades da espécie *Phaseolus vulgaris*. MARSHALL e LAUDA (1975a) relataram a inibição de α -amilases pancreática de porco e salivar humana em 8 variedades de feijão comum. Também em nosso laboratório, verificamos um comportamento semelhante em 3 cultivares através de técnica eletroforética citada anteriormente. Constatamos ainda que feijões das espécies *Vigna sinensis*, feijão de corda, e *Canavalia ensiformis*, feijão de porco, bem como a lentilha, *Lens esculenta*, não apresentam qualquer fração protéica inibidora de α -amilase (FINARDI FILHO e LAJOLO, 1982).

Coincidentemente, NAGAIRO (1981) descrevera, através de metodologia semelhante, os mesmos resultados em 15 variedades de *P. vulgaris* entre as 22 amostras de leguminosas analisadas. Em outro trabalho, KOTARU et al. (1987) também detectaram atividade antiamilásica somente nas 13 variedades de feijões comuns, de um total de 34 leguminosas. IGUTI e LAJOLO (1990) ampliaram os testes a 150 variedades de *P. vulgaris*. A inibição de amilase foi constatada em extrato bruto de todas variedades, com diferenças significativas de atividade específica.

Os trabalhos iniciais de isolamento e purificação de IAs de feijões limitavam-se a descrever apenas uma proteína ativa por variedade. MARSHALL e LAUDA (1975b) purificaram o inibidor glicoprotéico de feijão branco, com especificidade para α -amilase de mamíferos e peso molecular de 45.000 Daltons. Seguiram-se, então, os relatos de POWERS e WHITAKER (1977a) e de PICK e WÖBER (1978a), sobre as purificações do feijão vermelho e do branco, respectivamente.

O IA de feijão vermelho, além das amilases pancreática de porco e salivar humana, inibe também a enzima de *T. molitor*, possui 49.000 de peso molecular, com 8,6% de carboidratos e é composto por 4 subunidades peptídicas. Por outro lado, o feijão branco apresenta pequenas diferenças em relação ao vermelho, pois contém 15% de carboidratos em molécula de 43.000, dividida em 3 ou 4 protômeros de 15.500 ou 11.000 Daltons.

Em trabalhos anteriores com o feijão preto, cultivar Rico 23, isolamos e caracterizamos parcialmente um IA (LAJOLO, 1977; FINARDI FILHO, 1983; LAJOLO e FINARDI FILHO, 1984 e 1985). De modo geral, esse inibidor se assemelha aos demais acima descritos, apresentando uma molécula glicoprotéica de 53.000, com 3 subunidades, e 8,4% de carboidratos, sendo 5,4% de açúcares neutros e 3% de amino açúcares. O IA do feijão preto mostrou atividade, principalmente, sobre α -amilase salivar humana e pancreática de porco, e baixa atividade frente a enzimas de insetos. Também foram detectadas inibições de amiloglicosidases do gênero *Rhizopus* e de *Aspergillus niger* (LAJOLO e FINARDI FILHO, 1984).

Ainda em nosso laboratório foram realizados estudos cinéticos do IA do feijão preto, comprovando a estequiometria de 1:1 do complexo com α -amilase pancreática de porco. A formação do complexo, pH dependente, segue um padrão de reação de primeira ordem em pH 5,5, e de segunda ordem em pH 6,9 (TANIZAKI e LAJOLO, 1985).

Em trabalho mais recente confirmamos a necessidade de íons Cl^- e a dispensa dos íons Ca^{++} na formação do complexo enzima-inibidor (WHITAKER et al. 1988). Pelos dados de influência da temperatura e constante dielétrica do meio é possível afirmar que interações hidrofóbicas sejam fundamentais na reação de inibição.

A partir do trabalho de FRELS e RUPNOW (1984) houve mudanças na metodologia de isolamento dos IAs. Os autores descreveram a purificação de um segundo inibidor do feijão preto através de cromatografia de interação hidrofóbica. Esse inibidor, chamado de I-1, perde 95% de sua atividade a 70 °C em 5 minutos, enquanto o I-2 perde somente 50% de sua atividade em 30 minutos de aquecimento, na mesma temperatura. O I-2, portanto, seria equivalente à fração ativa descrita por POWERS e WHITAKER (1977a) e LAJOLO e FINARDI FILHO (1984).

Na seqüência desse trabalho, FRELS e RUPNOW (1985) demonstraram que os parâmetros bioquímicos de atividade de ambos inibidores do feijão preto, cultivar Ebony, são bem semelhantes em muitos aspectos. Por exemplo, ambos inibem a α -amilase pancreática via mecanismo não competitivo. Apenas a relação estequiométrica de complexação do I-1 com a enzima foi de 2:1, enquanto para o I-2 foi de

1:1. Empregando a mesma metodologia de obtenção, foram isolados também os inibidores do feijão branco, var. Great Northern UI-59 e do feijão vermelho, var. LRK-California (CINCO et al. 1985). Os IAs do feijão branco têm as mesmas características do feijão preto descritas acima, porém o feijão branco apresentou um único inibidor.

Algumas variedades purificadas em nosso laboratório também apresentaram um dos dois inibidores ou ambos, o que permite classificá-los em três diferentes grupos (IGUTI, 1988; IGUTI e LAJOLO, 1990). Os autores passaram a chamá-los de isoinibidores, devido às semelhanças de atividade anti-amilásica e à estabilidade térmica dessas proteínas. Uma classificação semelhante fora anteriormente sugerida por NAGAHIRO (1981), a partir de pequenas variações da mobilidade eletroforética de extratos de 13 cultivares.

Em resultados preliminares de ação dos IAs sobre amilases de mamíferos e aves, ficou demonstrada a seguinte ordem de especificidade: pancreática de boi > pancreática de coelho > pancreática de frango > pancreática humana > salivar humana > pancreática de cachorro > pancreática de camundongo > pancreática de rato > pancreática de cobáia (MIYAGUI¹). Os dados parecem indicar que mesmo possuindo domínios semelhantes, as α -amilases podem não ter em sua estrutura sítios específicos de interação com os IAs do feijão (LAJOLO e FINARDI FILHO, 1990).

Os únicos exemplos de IAs em outras leguminosas são encontrados no amendoim, *Arachis hypogaea* (IRSHAD e SHARMA, 1981), e no grão-de-bico, *Cicer arietinum* (SINGH et al. 1982). O inibidor do amendoim apresenta-se como um monopeptídeo de 25.000 Daltons, termorresistente a 65 °C, com estequiometria inibidor-enzima de 2:1, de natureza não competitiva. No caso do grão-de-bico a atividade inibidora foi detectada em extratos das cultivares Desi e Kabuli frente às enzimas pancreática e salivar, porém não houve isolamento e caracterização da molécula inibidora.

¹ - Resultados não publicados

2.3. Inibidores de α -Amilase de Microorganismos

Um grande número de trabalhos sobre obtenção e purificação de inibidores de α -amilase de origem microbiana, produzidos por fermentação, têm sido publicados por grupos de pesquisa ligados à indústria farmacêutica. O gênero *Streptomyces* é a fonte principal entre os microorganismos (FROMMER et al. 1979; WHITAKER, 1989), onde predominam dois tipos de IAs, um peptídico e, o outro, composto por oligossacárides nitrogenados.

Os inibidores peptídicos de α -amilase são, na maioria, produzidos por espécies de *Streptomyces*, com 4.000 a 8.500 Daltons, porém há exceções, como no mosto de *Cladosporium herbarum* que exporta um inibidor de peso molecular de 18.000 (SAITO, 1982).

O grupo de pesquisadores liderados por MURAO identificou quatro inibidores de α -amilase, chamados de HAIM I e II, a partir de cultura de *S. griseosporus* YM-25 (MURAO et al. 1980), e PAIM I e II, de cultura de *S. corchorusii* (MURAO et al. 1983, 1985), cuja diferença fundamental entre eles está na atividade específica. O HAIM inibe várias amilases de cinco espécies de mamíferos, em contraponto com PAIM, que age somente sobre amilase pancreática.

Em meio de cultura de *S. tendae* 4158 foram encontrados os IAs HOE 467A e 467S, com 74 resíduos de aminoácidos, estequiometria 1:1 com α -amilase e termorresistente a 90 °C, por um minuto, sem denaturação ou perda de atividade. Este produto foi denominado de Tendamistat, para ser empregado em casos de diabetes mellitus (VÉRTESY et al. 1984).

O outro grupo de IAs de origem microbiana é formado por oligossacárides contendo pelo menos um átomo de N; são obtidos do caldo de fermentação de muitas espécies de *Streptomyces*. Os principais representante desse grupo são as oligostatinas, as amilostatinas e as trestatinas.

Produzidas por *S. myxogenes*, as oligostatinas são inibidores de α -amilase consideradas antibióticos contra bactérias Gram-negativas (ITOH et al. 1981). São três produtos contendo a oligobioamina, um

pseudodissacáride, ligada a 3 ou 4 resíduos de glicose em suas moléculas (OMOTO et al. 1981).

As amilostatinas produzidas por *S. diastaticus* subsp. *amylostaticus* nº 9410 apresentam-se em seis diferentes estruturas. São formadas por uma deidro-oligobioamina, representada por X, ligada a resíduos de glicose (G), em número de um a três na extremidade redutora, e de um ou nenhum resíduo na extremidade não redutora (XG - GXGGG). As amilostatinas caracterizam-se por inibirem distintamente α -amilases, glicoamilases e invertase (FUKUHARA et al. 1982a, 1982b). Apenas para exemplificar, as amilostatinas que contém um resíduo de glicose na porção não redutora são mais específicas na inibição de endo-amilases, como as α -amilases pancreática e bacteriana, e taka-amilase A. Em contraposição, as moléculas XG a XGGG têm maior especificidade por exo-amilases, como as glicoamilases.

As trestatinas, obtidas de *S. dimorphogenes* NR320-OM7HB, constituem o grupo mais complexo desses inibidores. O mesmo pseudodissacáride apresentado nas amilostatinas, deidro-oligobioamina, é encontrado nas trestatinas ligado a um resíduo de glicose. Essa estrutura pode se repetir até três vezes, bem como ser precedida, ou não, por duas moléculas de glicose, perfazendo 6 moléculas distintas com atividade antiamilásica (YOKOSE et al. 1984).

2.4. Inibidores de α -Amilase de Tubérculos e Frutos

Os trabalhos sobre os IAs de tubérculos e frutos aparecem em número reduzido, não tendo havido o mesmo grau de desenvolvimento atingido pelos demais. Por exemplo, há um relato do inibidor β , obtido da casca de batata, dialisável, com estabilidade de 90% após ser autoclavado a 120 °C, por 10 min (HEMBERG e LARSSON, 1961), porém essas pesquisas não tiveram continuidade.

Posteriormente, SHIVARAJ et al. (1979) investigaram a presença de inibidores de α -amilase em 13 diferentes tubérculos e bulbos, tendo resultados positivos somente em duas variedades de inhame, *Colocasia antiquorum*, e em cará, *Dioscorea alata*. Esses inibidores atuam sobre α -amilases pancreáticas, humana e de porco, e salivar humana. Os

inibidores do inhame mostraram-se estáveis ao aquecimento a 100 °C, por 10 min.

A caracterização da fração ativa do inhame revelou a existência de dois inibidores protéicos de α -amilase (SHARMA e PATTABIRAMAN, 1980); possuem peso molecular de 14.300 e 12.500 Daltons e são resistentes ao ataque de pepsina, tripsina, quimotripsina e pronase. Em trabalho semelhante, os mesmos autores caracterizaram o inibidor glicoproteico do cará (SHARMA e PATTABIRAMAN, 1982). Esse inibidor se destaca por possuir 64% de carboidratos na molécula e ser inativado por tripsina e quimotripsina.

Um trabalho recente de SELTZER e STRUMEYER (1990) relata o isolamento de 2 inibidores de α -amilase do inhame com 11900 Daltons. Os IAs são estáveis à temperatura de ebulição por até 3h, às variações de pH na faixa de 2 a 12, bem como a agentes dissociantes, como uréia 6M e guanidina 8M. Assim como nos trabalhos anteriores, dos IAs de tubérculos, não houve perda de atividade após tratamento com tripsina e subtilisina.

Sobre os IAs encontrados em frutos há um registro de um inibidor endógeno na manga, *Mangifera indica*, cv. Alfonso (MATTOO e MODI, 1970), que apresenta natureza protéica, não dialisável, termolábil, e com padrão de inibição competitiva. Esse inibidor age ainda sobre α -amilase de banana (*Musa sp*). No mesmo trabalho, os autores se referem a outro inibidor endógeno obtido em bananas, que fora descrito anteriormente, porém a sua existência não foi confirmada.

Há também a citação de um IA em bolota, ou seja, fruto do carvalho, *Quercus pedunculata*, porém são conhecidos poucos detalhes desse inibidor (STANKOVIC e MARKOVIC, 1960-61). Testado em meio de fermentação de cevada e frente às α e β -amilases, o extrato de bolota inativou principalmente as β -amilases.

2.5. Aspectos Nutricionais

Ainda há uma certa cautela por parte dos pesquisadores em afirmar que os inibidores de α -amilase sejam considerados, ao lado das lectinas e dos inibidores de tripsina (IT), como fatores antinutricionais. Como

veremos a seguir poucos são os relatos científicos conclusivos sobre os efeitos fisiológicos da ingestão dos inibidores de α -amilase.

Num primeiro trabalho, SAVAIANO et al. (1977) não registraram diminuição na digestão de amido em ratos alimentados com IA de feijão em relação ao grupo controle. À mesma conclusão chegaram GRANUM e ESKELAND (1981) trabalhando com os inibidores do trigo, em ensaios com ratos e galinhas. Os autores constataram que não houve diferenças significativas nos níveis de glicose sérica de galinhas alimentadas com IA durante experimentos de 14 e 19 dias.

No início da década de 80 houve um princípio de comercialização de comprimidos chamados "bloqueadores de amido", contendo extrato de feijão e recomendados para regimes de emagrecimento. O fato levou alguns grupos de pesquisa a avançar os estudos em animais (HO et al. 1981) e em voluntários (BO-LINN et al. 1982; WOLEVER et al. 1983). Em nenhum deles, porém, ficou comprovada a eficácia da ingestão dos comprimidos. LIENER et al. (1984) demonstraram a presença de alta concentração de IT e lectinas em 10 diferentes marcas de bloqueadores de amido, sendo portanto totalmente inadequados para aquela finalidade. Logo em seguida esses produtos tiveram sua comercialização interrompida.

Numa tentativa de explicação da ineficiência do inibidor *in vivo*, ANDRIOLO et al. (1984) trataram o IA de feijão com suco gástrico e proteases. Apesar de resistir a ação da tripsina, o inibidor perdeu sua atividade ao ser acidificado em pH inferior a 3,0. Mais importante ainda foi a inativação causada pela quimotripsina em pH 8,1. Aparentemente, os IAs não suportariam o processo digestivo. No entanto, em trabalho anterior verificamos que o IA do feijão preto é resistente à proteólise frente às duas enzimas, bem como à protease fúngica em ensaios *in vitro* (LAJOLO e FINARDI FILHO, 1985).

Também em nosso laboratório, LAJOLO et al. (1984) registraram um retardo na digestão do amido em ratos alimentados com dieta rica em amido e IA de feijão, através de sonda gátrica. Num segundo experimento, com ratos normais e diabéticos, verificou-se a diminuição dos níveis séricos de glicose e insulina, e o aumento da metabolização de ácidos

graxos não esterificados. Esse comportamento ficou mais acentuado no grupo de ratos diabéticos (MENEZES e LAJOLO, 1987).

2.6. Estrutura dos Inibidores de α -Amilase

O estudo da estrutura dos inibidores de α -amilase está diretamente relacionado ao mecanismo de ação e à cinética de inibição. Devido às diversas configurações de IAs de várias origens, torna-se necessário localizar os sítios específicos de ligação de cada complexo enzima-inibidor.

Para atingirem esse objetivo, muitos autores têm promovido reações químicas em resíduos de aminoácidos e analisado o papel dos resíduos de açúcares. Por exemplo, o mecanismo de ação não competitivo, no IA de feijão, foi comprovado pela foto-oxidação de resíduos de histidina do sítio ativo da α -amilase pancreática, sem causar, no entanto, alterações na formação do complexo com o inibidor (TANIZAKI et al., 1985). Essa ligação também independe da fração glicídica, pois o inibidor continua ativo após tratamento com endoglicosidase (WILCOX e WHITAKER, 1984), porém a oxidação com periodato de potássio conduz à perda de atividade (TANIZAKI et al., 1985).

Várias abordagens foram desenvolvidas para caracterizar os IAs, porém a tendência atual tem sido o seqüenciamento das moléculas para revelação da estrutura primária. Desse modo pode se tornar mais viável a localização dos sítios de interação inibidor-enzima. Também neste aspecto, os inibidores de cereais são os mais conhecidos (MAEDA et al. 1983; CAMPOS e RICHARDSON, 1984).

Numa revisão sobre os inibidores de tripsina e α -amilase, GARCIA-OLMEDO et al. (1987) analisaram o grau de homologia dos IAs de várias fontes de cereais em confronto com os ITs. A homologia entre as subunidades dos inibidores tetraméricos do trigo e da cevada situam-se entre 33 e 86%. Quanto maior a homologia das moléculas, maior também a probabilidade de ascendência genética comum. Apenas a título de ilustração, para os inibidores diméricos do trigo, 0,19 e 0,28, o grau de homologia é de apenas 26 a 41%, que pode significar diferentes genes

codificando cada um deles, ou ainda, que as proteínas sofrem modificações pós-translacionais.

Recentemente revisamos os dados da literatura sobre as estruturas dos IAs de feijões (YIN et al. 1990). Numa análise da composição de aminoácidos de 8 diferentes inibidores, pudemos verificar que o número médio de resíduos, de cada aminoácido, é estatisticamente igual à composição deduzida do cDNA que codifica o IA da variedade Greensleaves (MORENO e CHRISPEELS, 1989).

A identificação do DNA do inibidor do feijão, permitiu ao grupo de Chrispeels expressar o IA em folhas de fumo, *Nicotiana tabacum*, que passaram a apresentar atividade anti-amilásica, apesar das diferenças estruturais em relação à molécula original (ALTABELLA e CHRISPEELS, 1990). Em outro trabalho, MORENO et al. (1990) afirmam que o gene isolado, α AI, é típico de lectina de feijão, pois a proteína é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso, modificada no sistema de Golgi e transportada aos vacúolos protéicos de reserva, como acontece com aquelas proteínas.

Paralelamente, as estruturas químicas dos IAs de microorganismos, pelo fato de serem de constituição mais simples, são de há muito conhecidas. Além dos pseudo-oligossacárides mostrados anteriormente (FUKUHARA et al. 1982), os inibidores peptídicos também tiveram suas estruturas determinadas. O Tendamistat teve a conformação tridimensional e o sítio de inibição revelados (KLINE et al. 1986; PFLUGRATH, et al. 1986). Neste peptídeo os resíduos de Trp18-Arg19-Tyr20 formam o tripé responsável pela inibição enzimática.

Pela análise dos dados da literatura sobre os IAs de feijão, nota-se que ainda há muitos pontos que mereceriam ser mais investigados. Entre eles, destacamos os mecanismos de inibição, o papel antinutricional, o papel fisiológico, o fator de resistência ao ataque de insetos e a estrutura química dessas proteínas. Porém de todos, a compreensão da estrutura parece-nos de importância fundamental, pois está intimamente relacionada aos demais tópicos. Mais especificamente, ainda restam dúvidas quanto à conformação e manutenção da estrutura molecular, às modificações citoplasmáticas pós-translacionais, a similaridade dos

isoinibidores, a transcrição dos isoinibidores a partir de um único gene, entre outros.

3. OBJETIVOS

No presente trabalho nos propusemos a estudar os isoinibidores de α -amilase do feijão preto, com os seguintes objetivos específicos:

- Complementar o conhecimento sobre as características químicas básicas do inibidor termossensível, já determinadas para a molécula do inibidor termorresistente;

- Isolar e caracterizar, comparativamente, as subunidades peptídicas de ambos inibidores.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Feijão

Foram utilizadas sementes selecionadas do feijão preto, variedade Rico 23, obtidas junto à Estação Experimental de Agricultura, Escola Superior de Agricultura de Lavras, MG.

4.1.2. Reagentes

Foram utilizados reagentes de grau analítico para as análises rotineiras, e ultrapuros ou grau HPLC para as cromatografias de alta resolução. Acrilamida, N,N'-metileno bis-acrilamida, β -mercapto-etanol, ácido *cis*-parinário (CPA), Coomassie G e R, tris (hidroximetil) aminometano (TRIS) e dodecil sulfato de sódio (SDS) foram adquiridos da Sigma Chemicals, Co.; os anfólitos Pharmalyte 3/10 e Bio-Lyte 3/5 e 5/7 foram obtidos da Pharmacia e Bio Rad, respectivamente; etilenoglicol, acetonitrila, metanol, ácidos tricloroacético (TCA), trifluoroacético (TFA) e 3,5-dinitrossalicílico (DNS) foram fornecidos pela Quimitra/Merck; uréia e sulfato de amônio foram da Nuclear.

Nas eletroforeses e nas cromatografias de alta resolução foi utilizada água ultrapurificada em sistema Nanopure/Barnstead. Nas demais análises a água empregada foi destilada em vidro e deionizada em coluna de troca iônica.

4.1.3. Meios de Separação e Cromatográficos

As membranas de filtração molecular utilizadas na concentração das proteínas, com limite de exclusão de 10.000 Daltons, foram fornecidas por Amicon Co. e Millipore. Os tubos de diálise da Allied Fisher Scientific excluíam moléculas de até 10.000 a 12.000 Daltons.

Os meios cromatográficos, Sephadex G-100, Octyl- e Phenyl-Sepharose CL 4B, as colunas de cromatografia em FPLC e HPLC, Mono

Q, Superose 12, G 3000 SWG e TMS-250, foram obtidos da Pharmacia-LKB Biotecnologia e Diagnóstico. A resina de troca iônica DEAE-celulose, DE 22, foi adquirida da Whatman.

4.1.4 Proteínas e Enzimas

As proteínas empregadas como padrões de peso molecular nas cromatografias de filtração em gel foram da Pierce; os padrões para as eletroforeses, MW-SDS 70L kit, foram da Sigma e os de focalização isoelétrica, IEF kit, foram da Pharmacia.

A α -amilase, tipo I-A, tratada com di-isopropil-fluorofosfato, e a tripsina, tipo IX, ambas de pâncreas de porco, foram obtidas da Sigma. Por outro lado, a α -amilase salivar humana foi purificada em nosso laboratório conforme descrição anterior (FINARDI FILHO e LAJOLO, 1982).

4.2. Métodos

4.2.1. Isolamento e Purificação

O esquema de extração, isolamento e purificação dos IAs do feijão preto encontra-se resumido na Figura 1. A extração aquosa dos inibidores foi desenvolvida como descrito anteriormente (LAJOLO e FINARDI FILHO, 1984). O isolamento preliminar dos IAs seguiu as duas etapas da precipitação com sulfato de amônio recomendadas por FRIELS e RUPNOW (1984).

O sedimento resultante da segunda precipitação foi dissolvido em água e dialisado, primeiro contra água destilada por 24 h, e em seguida contra água deionizada por 48 h, com pelo menos 6 trocas ao dia. O material dialisado foi então centrifugado a 8.000 g, por 30 min, eliminando-se o precipitado. O sobrenadante foi concentrado em membrana de filtração molecular e o meio ajustado com tampão fosfato 0,1M, pH 7,6, de modo a obter 0,02M de concentração final de fosfato.

A purificação dos IAs segue com a cromatografia em DEAE-celulose, conforme metodologia anterior (LAJOLO e FINARDI FILHO, 1984), em tampão fosfato 0,02M, pH 7,6, denominado de tampão fosfato

EXTRAÇÃO AQUOSA

PRECIPITAÇÃO
(NH₄)₂SO₄ 30% sat.

PRECIPITAÇÃO
(NH₄)₂SO₄ 60% sat.

DIÁLISE
H₂O / TFP

CROMATOGRAFIA
DEAE-celulose, TFP

CROMATOGRAFIA
Octyl/Phenyl-Sepharose
TF 0,05M, pH 6,9

CROMATOGRAFIA
Sephadex G-100, TFP

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Figura 1. Esquema de purificação dos inibidores de α -amilase do feijão preto, cultivar Rico 23.

padrão, ou simplesmente TFP. A fração ativa contra α -amilase foi reunida e novamente precipitada com sulfato de amônio, até atingir 60% de saturação. O precipitado, recolhido por centrifugação como descrito acima, foi dissolvido em TFP, acertando a concentração de sulfato de amônio para 30% de saturação.

Segue-se, então, a cromatografia de interação hidrofóbica, conforme recomendado por FRIELS e RUPNOW (1984). Foram empregados dois tipos de resinas, Octyl- e Phenyl-Sepharose CL 4B, em colunas de 1,5 x 30 cm. As frações ativas coletadas, 5 ml/tubo, foram reunidas, dialisadas e concentradas em membranas filtrantes. Alternativamente, a concentração das frações foi realizada por precipitação com sulfato de amônio até 60% de saturação, ou ainda, por liofilização após a diálise.

A etapa final de purificação dos inibidores incluiu a cromatografia em Sephadex G-100. As separações foram realizadas em coluna de 2,5 x 95 cm, em TFP, com fluxo de 15 ml/h, coletando-se frações de 5 ml. Em cada cromatografia, o pico protéico com atividade inibidora da α -amilase salivar foi reunido, dialisado e liofilizado.

4.2.2. Determinação de Proteínas

O conteúdo protéico dos extratos e soluções foi determinado pelo método de LOWRY et al. (1951), empregando-se soluções de 50 a 250 μ g de albumina sérica bovina como padrão. Rotineiramente, o acompanhamento dos eluatos das cromatografias foram realizados em espectrofotômetro ou em detector de UV, nos comprimentos de onda de 280nm, 214nm ou 206nm.

4.2.3. Determinação de Carboidratos

A análise da porção glicídica das moléculas dos IAs foi realizada pelo método de DuBOIS et al. (1956), através da reação com fenol-ácido sulfúrico, e leitura a 480 nm. A glicose foi utilizada como padrão na determinação.

4.2.4. Eletroforese

As eletroforeses em géis de poliacrilamida (PAGE), para analisar a homogeneidade das preparações dos IAs, foram desenvolvidas pelo método de DAVIS (1965). As corridas eletroforéticas foram realizadas a 15 °C em tubos de 4 x 60 mm, ou em placas de 0,75 x 40 x 75 mm, através de géis com 7% ou 10% do monômero.

O sistema eletroforético desenvolvido por LAEMMLI (1970), na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), foi empregado na análise das proteínas dissociadas. As eletroforeses foram desenvolvidas em géis planos, com 10 ou 12,5% de acrilamida, nas dimensões já descritas, termostatizadas a 15°C.

Em qualquer sistema utilizado, a revelação das bandas protéicas, após as corridas, foi feita por imersão do gel em solução de Coomassie R 0,25%, em mistura etanol/ácido acético/água (40:7:53). Os géis foram mantidos sob agitação suave e constante por 2 h, e descorados por difusão na mesma mistura etanólica.

4.2.5. Focalização Isoelétrica

A focalização isoelétrica (IEF) foi executada em placas de PAGE nas dimensões de 0,75 x 70 x 75 mm, em gel de 5% de acrilamida, contendo 5% de mistura de anfólitos 3/10, 3/5 e 5/7, na proporção 4:3:3, com base no método descrito por WRIGLEY (1971). As corridas foram desenvolvidas a 15°C, com soluções eletrolíticas de ácido fosfórico 0,01M e hidróxido de sódio 0,02M, para o anodo e o catodo, respectivamente.

Depois da fixação das mesmas em TCA 15% durante 15 min, as bandas proteínas foram reveladas por Coomassie G, 0,05% em mistura etanólica, por 10 a 20 min. Quando necessário o descoramento foi feito em mistura etanólica sob agitação.

4.2.6. Determinação de Atividade dos Inibidores de α -Amilase

A atividade dos inibidores foi avaliada tanto com α -amilase salivar, como com pancreática de porco, segundo metodologia descrita anteriormente (LAJOLO e FINARDI FILHO, 1984). Foi utilizado amido reduzido como substrato das enzimas, conforme recomendado por STRUMEYER (1967).

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

4.2.7. Peso Molecular

Os pesos moleculares dos inibidores foram determinados em coluna de 16 x 950 mm, 190 ml de volume de Sephadex G-100, em fluxo de 9 ml/min de TFP, mantido por bomba peristáltica (P-1, Pharmacia). As corridas em idênticas condições foram conduzidas a 22°C, monitoradas a 206nm, com a aplicação de 4mg de cada proteína. Além das amostras foram cromatografadas ferritina, albumina sérica, ovalbumina quimotripsinogênio A e citocromo C, como referências (ANDREWS, 1964).

O cálculo foi realizado através de regressão logarítmica dos pesos moleculares em função das constantes cromatográficas das proteínas, pela relação

$$K_c = \frac{V_{el} - V_o}{V_t - V_o}$$

onde, K_c = constante cromatográfica,
 V_{el} = volume de eluição,
 V_o = volume de exclusão = V_{el} ferritina,
 V_t = volume total de gel = 190 ml.

4.2.8. Determinação da Hidrofobicidade Superficial

Através do método de KATO e NAKAI (1980), com o auxílio do ácido *cis*-parinárico, foram determinados os valores de hidrofobicidade superficial dos IAs nas suas conformações nativas. A albumina sérica foi empregada como padrão e, assim como as amostras, dissolvida em

tampão fosfato de potássio 0,01M, pH 7,4, com 0,002% de SDS. A análise foi realizada em fluorímetro Perkin-Elmer LS-5, em comprimento de onda de excitação de 420 nm e de 325 nm de emissão, em fenda fixa de 2,5mm. A decalina foi empregada como referência de calibração do equipamento.

4.2.9. Análise de Amino Ácidos

A análise da composição de amino ácidos foi realizada em analisador automático Beckman, mod. 120 C, segundo SPACKMAN et al. (1965), com reação de ninhidrina. As hidrólises foram efetuadas em tubos com tampas de teflon, sob atmosfera de N_2 , em HCl 6,6N, a 110 °C, durante 22 horas.

4.2.10. Hidrólise Triptica

Inicialmente as moléculas dos IAs foram dissociadas em uréia 6M e SDS 1%, ou em guanidina 8M, durante 1 h, a 37°C. Seguiram-se então a diálise contra água e a liofilização do meio. As hidrólises foram conduzidas em tampão NH_4HCO_3 0,1M, pH 8,0, com 0,5M $CaCl_2$, com a adição de 5%, em massa, de tripsina em relação ao substrato. Foi utilizado um tempo único de hidrólise por 5 h, a temperatura de 37°C.

As análises dos hidrolisados foram realizadas a princípio em coluna de troca iônica, Mono Q/FPLC, em tampão Tris-HCl 0,02M, pH 8.1, com eluição por gradiente entre 0 e 1M de NaCl, acompanhada por absorção em 214nm. Os hidrolisados foram ainda cromatografados em coluna de fase reversa, TMS-250/HPLC, de 4,6 x 75mm, com partículas de 10 μ m, e com pré-coluna de Licrosorb C-18. Os peptídeos foram injetados em solução A, contendo TFA 0,1%, e eluídos com gradiente de 20 a 100% de solução B, composta por 50% de acetonitrila, em TFA 0,1%. O registro das frações foi realizado após detecção em 206 nm.

4.2.11. Separação das Sub-Unidades

Os inibidores foram tratados com uréia 6M, SDS 1% e β -mercaptoetanol 1%, incubados a 37°C, durante 1 hora. O material resultante foi cromatografado em coluna de DEAE-celulose, 9 x 250 mm,

TFP, com gradiente de 0 a 0,5M de NaCl no mesmo tampão. A monitoração do eluente foi feita em detetor UV com filtro de 280 nm. As frações correspondentes aos picos de absorção deste último sistema foram reunidas, dialisadas e liofilizadas.

4.2.12. Emissão de Fluorescência

Foram analisados os espectros de emissão de fluorescência dos IAs em condições nativas e dissociantes, por excitação a 280 nm. Os inibidores foram dissolvidos em tampão fosfato 0,02M, pH 7,6, ou em concentrações crescentes, até 6M, de uréia, no mesmo tampão. Os ensaios foram mantidos em banho a 37°C, por 1h, resfriados e analisados (VAN DEN OETELAAR e HOENDERS, 1989). Alguns pontos do experimento foram posteriormente repetidos, dialisados, e submetidos à nova leitura fluorimétrica.

4.2.13. Calorimetria Diferencial

Através de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram analisados os pontos de denaturação térmica dos IAs, bem como a entalpia do sistema em meio a tampões regulares e dissociantes. Para tanto, foi utilizado o equipamento Perkin-Elmer, mod. DSC-7, associado à unidade processadora 3700 Data Station, com auxílio do programa PETOS-DELTA. As amostras foram preparadas em cápsulas herméticas de alumínio, com cerca de 2mg de proteína e 10 μ l de tampão. A velocidade de aquecimento foi fixada em 10°C /min e as corridas desenvolvidas entre 40 e 120°C.

4.2.14. Seqüenciamento de Amino Ácidos

O seqüenciamento de amino ácidos foi realizado automaticamente pelo método de EDMAN e BEGG (1967), na Universidade de Purdue, Indiana (EUA). Foram utilizados os peptídeos isolados através de cromatografia de DEAE-celulose/uréia descrita acima.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Purificação

Durante os vários processos de obtenção dos IAs foram sendo introduzidas pequenas modificações na metodologia de purificação, com o objetivo de aumentar o rendimento e facilitar a remoção de proteínas contaminantes. Os dados apresentados a seguir estão relacionados às etapas de purificação, cujo esquema geral de procedimento adotado encontra-se resumido na figura 1, anteriormente apresentada.

5.1.1. Extração e Fracionamento

Inicialmente, foram seguidos os procedimentos de trituração das sementes e extração aquosa preconizados em trabalhos anteriores (LAJOLO, 1977; FINARDI FILHO e LAJOLO, 1984), adotando-se em seguida o fracionamento com sulfato de amônio, segundo FRELS e RUPNOW (1984). Após o fracionamento, foi introduzida uma etapa de diálise exaustiva do precipitado contra água destilada, com a finalidade de remover as globulinas.

A diálise como etapa de purificação foi empregada anteriormente em nosso laboratório no isolamento de albuminas e globulinas de extratos de feijão (LANFER-MARQUEZ e LAJOLO, 1981). Utilizando o mesmo procedimento, obteve-se a coprecipitação de globulinas e pigmentos, clarificando o sobrenadante rico em albuminas. De fato, a diálise contra água destilada possibilitou a redução de 55% do total de proteínas que seriam cromatografadas em DEAE-celulose (Tabela 1).

Nota-se também, através do controle da preparação (Tabela 1), que a atividade total dos inibidores permaneceu praticamente inalterada, ao longo das etapas acima descritas, havendo apenas diminuição da massa protéica isolada após a diálise contra água. Nesse ponto, a atividade específica dos IAs em solução foi 2,6 vezes superior àquela encontrada antes da diálise.

TABELA 1 - Controle da preparação dos inibidores de α -amilase^a.

Etapas	Volume (ml)	Proteína		Atividade		Ativ.Espec. U/mg	Fator purif.
		mg/ml	Total	U/ml	Total		
Extrato Bruto	680	6,20	4219	33,5	22780	5,40	1,00
30% (NH ₄) ₂ SO ₄	730	5,67	4136	29,0	21170	5,10	0,94
60% (NH ₄) ₂ SO ₄	140	12,30	1722	162,0	22680	13,20	2,44
Diálise c/ H ₂ O	272	2,25	612	77,8	21162	34,60	6,41
Ppt. diálise	140	5,39	756	31,8	4452	5,90	1,09
Diálise c/tampão	236	5,83	1376	90,0	21240	15,44	2,86

a) A partir de 200g de farinha integral de feijão.

Porém, o mesmo não aconteceu com idêntica porção de precipitado com sulfato de amônio submetida à diálise contra TFP. Nota-se que restou praticamente a mesma concentração de proteínas que foram precipitadas (Tabela 1), além da permanência dos pigmentos. Portanto, supõe-se que os pigmentos estejam associados às globulinas durante a precipitação ou, como elas, sejam insolúveis em soluções de baixa força iônica.

5.1.2. Cromatografia em DEAE-Celulose

No passo seguinte, o perfil cromatográfico em DEAE-celulose (Fig. 2) mostrou-se muito semelhante àquele obtido anteriormente (LAJOLO e FINARDI FILHO, 1984). O pico protéico principal, que contém os inibidores de α -amilase, apresenta a mesma forma daquele obtido no trabalho anterior, após a aplicação do gradiente de NaCl. Há, porém, uma diminuição nas dimensões da fração protéica contaminante, primeiro pico, proporcionalmente ao pico que contém os IAs. Este resultado confirma que a remoção de globulinas, citadas acima, não interfere com o rendimento da preparação, bem como que elas são eliminadas em parte pelas precipitações com etanol, .

5.1.3. Cromatografia de Interação Hidrofóbica

Conforme verificado em nosso laboratório (IGUTI e LAJOLO, 1990), a cromatografia em gel de interação hidrofóbica, da fração obtida da etapa anterior, pode ser realizada em Octyl ou Phenyl-Sepharose. Neste trabalho foram utilizados os dois géis, comparativamente (Fig. 3 e 4). Em ambas cromatografias houve boa resolução dos inibidores I-1 e I-2, assim como no relato de FRELS e RUPNOW (1984), que utilizaram apenas a Phenyl-Sepharose.

Nas cromatografias apresentadas nota-se que a separação dos IAs em gel de Octyl-Sepharose (Fig. 3), indicado para proteínas de baixo grau de hidrofobicidade, teve melhor resolução em relação ao gel de Phenyl-Sepharose (Fig. 4). Entretanto, ao longo de várias preparações, este último mostrou-se mais adequado, devido a reprodutibilidade dos resultados. O sistema em Octyl-Sepharose retém os pigmentos que foram

Figura 2. Cromatografia em coluna de DEAE-celulose. O extrato fracionado e dialisado foi equilibrado com TFP e aplicado à coluna cromatografica. Após a estabilização da linha base foi aplicado o gradiente de NaCl no mesmo tampão. A barra horizontal indica as frações ativas reunidas.

Figura 3. Cromatografia em coluna de Octyl-Sepharose CL 4B. A fração protéica da cromatografia em DEAE-celulose foi equilibrada com tampão fosfato 0,05M, contendo sulfato de amônio a 25% de saturação, e aplicada à coluna. O gradiente decrescente em sulfato de amônio e crescente em etilenoglicol iniciou-se após a estabilização da linha base. As barras horizontais indicam as frações de I-1 e I-2 reunidas.

Figura 4. Cromatografia em coluna de Phenyl-Sepharose CL 4B. O procedimento empregado foi o mesmo da cromatografia anterior em Octyl-Sepharose.

co-eluídos com os IAs da coluna de DEAE-celulose, diminuindo a capacidade de retenção do gel. Consequentemente, a cada nova corrida a eluição das proteínas era antecipada até o ponto de não haver mais retenção dos IAs no gel, eluindo juntamente com os contaminantes.

Na cromatografia em Phenyl-Sepharose a sobreposição dos picos de eluição dos inibidores é devida ao aumento do valor da linha base, causado pelos compostos fenólicos dos pigmentos. Este mesmos pigmentos têm um pico de eluição em seguida ao I-2, retornando a linha base aos valores iniciais (Fig. 4).

5.1.4. Cromatografia em Sephadex G-100

As figuras 5 e 6 mostram a etapa final da purificação dos inibidores I-1 e I-2, respectivamente. Os perfis de eluição das proteínas em Sephadex G-100 estão relacionados com a amplitude das frações reunidas na fase anterior. Ou seja, quanto maior a faixa de abrangência das frações, maior é a contaminação, resultando picos laterais de proteínas conforme demonstrado na figura 5.

O controle de purificação das preparações foi realizado por eletroforese em condições nativas. Conforme se pode verificar na figura 7, as preparações mostraram-se homogêneas, com valores de mobilidade relativa muito próximos, 0,41 para o I-1 e 0,47 para o I-2, em géis de 10% de acrilamida.

Esta etapa marca o fim da purificação dos dois IAs. As frações aqui obtidas foram dialisadas exaustivamente contra água destilada e, nos últimos três volumes, com água ultrapurificada, seguindo-se o congelamento e a liofilização. O material liofilizado foi mantido à temperatura ambiente em frasco de polietileno, hermeticamente fechado.

5.2. Características Químicas

Como primeiro passo na identificação de propriedades bioquímicas e fisiológicas, a caracterização química tem revelado parâmetros importantes do comportamento dos inibidores. No caso dos IAs do feijão Rico 23, tivemos inicialmente a caracterização do I-2 (FINARDI FILHO,

Figura 5. Cromatografia do I-1 em coluna de Sephadex G-100. As primeiras frações ativas reunidas nas cromatografias de interação hidrofóbica foram previamente equilibradas em TFP. A barra horizontal indica as frações ativas reunidas.

Figura 6. Cromatografia do I-2 em coluna de Sephadex G-100. O procedimento foi o mesmo do empregado ao I-1.

Figura 7. Eletroforese dos inibidores purificados. Foram aplicados 10 μ g das proteínas no gel com 10% de acrilamida, corridas em condições nativas em direção ao anodo, com 10 mA de corrente.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

1983; LAJOLO e FINARDI FILHO, 1985), onde foram determinados o peso molecular, o ponto isoelétrico, o conteúdo de carboidratos e a composição de amino ácidos. Posteriormente, com o isolamento do I-1 foram realizados testes comparativos de resistência térmica dos dois inibidores (IGUTI e LAJOLO, 1990), apontando-os como isoinibidores. Porém, não foram efetuadas as determinações citadas acima, que poderiam servir de indicadores mais precisos para confirmá-los como isoinibidores.

A seguir serão apresentados e discutidos os resultados obtidos na caracterização química comparativa de ambas proteínas. Esses dados, se houver correspondentes, serão também comparados com os dados existentes na literatura científica.

5.2.1. Carboidratos

Assim como todos IAs de feijões descritos anteriormente, o I-1 da cultivar Rico 23 também apresenta-se como glicoproteína. Através da reação com fenol-ácido sulfúrico, foram determinados 9,9% de açúcares no I-1 e 12,1% no I-2. Na tabela 2 os resultados acima são comparados aos dos demais inibidores de feijões.

Oscilando entre 7,5 e 15%, o conteúdo de carboidratos dos IAs de feijão pode ser tomado como mais um parâmetro de diferenciação molecular. Pelos dados da Tabela 2 nota-se que os inibidores do grupo 1 apresentam valores médios de 9,6%, enquanto os I-2 situam-se em torno de 12,2%. Na terceira coluna da mesma tabela foram agrupados 3 inibidores que não foram confirmados como único da variedade estudada. Aparentemente, há uma tendência nesse grupo de apresentarem conteúdo médio de açúcar acima dos anteriores (13,2%), podendo se tornar efetivamente num terceiro grupo de IAs, como sugeriram NAGAHIRO (1981) e IGUTI e LAJOLO (1990).

5.2.2. Peso Molecular

A tabela 3 apresenta um resumo dos dados referentes à determinação de peso molecular através de cromatografia em Sephadex

TABELA 2 - Conteúdo de carboidratos dos inibidores de α -amilase de feijão.

Feijões	I-1	I-2	Únicos
preto cv. Rico 23	9,9	12,1 (14,5) ^a	---
preto cv. Ebony ^b	7,5	9,0	---
preto ^d	9,9	10,2	---
vermelho ^{c,e}	---	---	13,0 ^h
pinto ^{c,f}	---	---	14,0 ^h
branco ^{c,d}	---	---	11,0 ⁱ
branco ^{c,g}	---	---	15,0 ^h

a) LAJOLO & FINARDI FILHO (1985)

b) FEELS & RUPNOW (1984)

c) cv. não especificado

d) YIN et al (1990)

e) WILCOX & WHITAKER (1984b)

f) KOTARU et al (1987)

g) PICK & WÖBER (1978a)

h) IA não especificado

i) único inibidor

TABELA 3 Valores dos pesos moleculares, velocidade de eluição e constante cromatográfica. Os valores de V_{el} , obtidos por calibração da coluna analítica de Sephadex G-100, foram utilizados para o cálculo de K_c .

Proteína	Peso Molecular	V_{el}	K_c
Ferritina	540.000	67,5	
Albumina Sérica	67.000	90,0	0,1837
Ovalbumina	45.000	99,0	0,2571
Quimotripsinogeo A	25.000	123,8	0,4592
Citocromo C	12.500	139,5	0,5878
I-1	58.000	94,0	0,2163
I-2	51.000	97,9	0,2480

G-100. Com base nos valores dos volumes de eluição (V_e), das proteínas de referência, foram calculadas as constantes cromatográficas (K_c) que permitiram a elaboração da reta de regressão (Fig. 8). Os valores de K_c dos I-1 e I-2, extrapolados na figura 8, forneceram os pesos moleculares de 58000 e 51000 Daltons, respectivamente.

O valor atual de peso molecular do I-2 está 2000 Daltons abaixo dos 53000 determinados anteriormente (LAJOLO e FINARDI FILHO, 1985), devido também à contaminação da antiga preparação, porém dentro da margem de variação admitida naquele trabalho. Entretanto, o peso molecular correto somente será determinado com a seqüência completa de amino ácidos e açúcares. Enquanto isso, serão utilizados os atuais valores com referenciais para as próximas etapas deste trabalho.

Analisando comparativamente os pesos moleculares dos IAs descritos para o feijão, constata-se que eles se concentram numa faixa entre 42 e 60 KDaltons (Tabela 4); diferentes portanto dos inibidores dos cereais, onde a dispersão é maior, que indica o polimorfismo, já constatado nos IAs do trigo (BEDETTI et al. 1974).

5.2.3. Ponto Isoelétrico

A determinação dos pontos isoelétricos dos IAs, realizada através de focalização em placas de poliacrilamida, revelou bandas protéicas em duas zonas distintas de pH para ambos inibidores (Fig. 9). A representação gráfica do deslocamento das proteínas de referência da figura 9 mostra o gradiente de pH ao longo da placa, bem como permite a extrapolação das bandas dos IAs (Fig. 10). Os valores calculados dos pontos isoelétricos foram 4,70 e 4,80, para o I-1, e 4,65 e 4,80, para o I-2.

Pelos atuais resultados, o I-2 está com valores superiores em pelo menos 0,3 em relação às determinações anteriores (LAJOLO e FINARDI FILHO, 1985), porém são concordantes com os dados de YIN², que empregou metodologia semelhante. Portanto, as diferenças verificadas podem ser creditadas à mudança de géis de corrida, de tubo para placa, que permitiu melhor resolução das bandas.

² - Resultados não publicados

Figura 8. Determinação do peso molecular. Curva das constantes de eluição das proteínas, em coluna analítica de Sephadex G100, em função dos pesos moleculares. Os valores de Kc para os inibidores foram extrapolados na curva, obtendo 58.000, para o I-1, e 51.000 Daltons, para o I-2.

TABELA 4 Comparação dos pesos moleculares dos inibidores de α -amilase de feijão.

Feijões	I-1	I-2	únicos
preto cv. Rico 23	58.000	51.000	
preto cv. Ebony ^a	49.000	47.000	
preto ^{b,c}	60.000	49.000	
vermelho ^{c,d}			49.000
pinto ^{c,e}			45.000
branco ^{b,c}			42.000
branco ^{c,f}			43.000
branco ^{c,g}			49.000

a) FRELS e RUPNOW (1984).

b) YIN et al. (1990).

c) cv. não especificado.

d) WILCOX e WHITAKER (1984b).

e) KOTARU et al. (1987).

f) PICK e WÖBER (1978a).

g) MARSHALL e LAUDA (1975b).

Figura 9. Focalização isoeétrica dos inibidores. Nas faixas laterais se encontram as proteínas marcadoras, de pI conhecido, e nas centrais os inibidores 1 e 2. Foram aplicados cerca de $2 \mu g$ de amostra e $4 \mu g$ de marcadores. A corrida se desenvolveu por 30min a 200V, 1h a 300V e 2h a 400V, em temperatura constante de $15^{\circ}C$.

Figura 10. Determinação dos pontos isoeletricos dos inibidores. Curva referente às distâncias de migração das proteínas marcadoras em relação aos pontos isoeletricos.

5.2.4. Composição de Amino Ácidos

A composição de amino ácidos dos inibidores obtida por hidrólise ácida encontra-se na tabela 5. Não foram determinados os amino ácidos sulfurados e o triptofano, perdidos durante a hidrólise. Para o cálculo do número de resíduos por mol foram tomados com referenciais os pesos moleculares de ambos, descontadas as respectivas frações glicídicas de cada molécula.

O presente resultado encontra-se de acordo com outros inibidores de feijão, dentro de um desvio em torno da média conforme havíamos assinalado em recente revisão (YIN et al, 1990). As duas proteínas também são semelhantes à composição deduzida da seqüência do cDNA que codifica a proteína semelhante à lectina, realizada por MORENO e CHRISPEELS (1989).

É curioso notar, pelos dados da separação em colunas de Octyl e Phenyl-Sepharose, que o I-1 é sempre o primeiro a ser eluído, ou seja, possui menor número de interações hidrofóbicas por molécula do que o I-2. Porém, pela análise detalhada dos resultados da tabela 5, a proporção de resíduos hidrofóbicos é praticamente a mesma em ambas moléculas, 37,9% para o I-1 e 38,8% para o I-2. No entanto, se for considerado apenas o número de resíduos hidrofóbicos por molécula, o I-1 teria ainda uma pequena superioridade em relação ao I-2: 171 contra 145.

5.2.5. Hidrofobicidade Superficial

A hidrofobicidade superficial da molécula nativa dos IAs foi determinada pela emissão de fluorescência após reação com ácido *cis*-parinárico, CPA (KATO e NAKAI, 1980). Os dados, obtidos da inclinação da curva de concentração protéica, S_0 , foram comparados com os valores de albumina sérica tomados como padrão. Os resultados de S_0 foram 13,4 para o I-1 e 36,7 para o I-2.

Nota-se portanto que a hidrofobicidade superficial do I-2 nativo é realmente superior à do I-1, como era esperado, devido à eluição das proteínas nas cromatografias em Octyl e Phenyl-Sepharose (Fig. 3 e 4).

TABELA 5 Composição de amino ácidos dos inibidores de α -amilase do feijão preto cv. Rico 23. Os valores expressam o número de resíduos por molécula¹.

Amino ácidos	I-1	I-2
lisina	22	14
histidina	9	8
arginina	13	10
ácido aspártico	57	60
treonina ²	37	35
serina ²	56	58
ácido glutâmico	47	34
prolina	15	14
glicina	29	20
alanina	26	20
valina	40	41
isoleucina	22	17
leucina	26	20
tirosina	15	11
fenilalanina	27	22

1) Não foram determinados os resíduos de trp, cys e met.

2) Os valores de thr e ser corrigidos em 10 e 5% respectivamente.

Estes resultados indicam que o I-1 possui menos regiões hidrofóbicas na sua superfície, ou ainda, que tais grupos se encontram distribuídos de forma mais homogênea ao longo da cadeia. Ao contrário, o I-2 possuiria resíduos hidrofóbicos agrupados, formando um ou mais domínios com maior capacidade de interagir com compostos anfifílicos e hidrofóbicos.

Admitidas estas hipóteses, pode-se inferir que as seqüências de amino ácidos dos IAs sejam distintas, de modo a conferirem configurações moleculares próprias. Dessa forma, seria difícil admitir a hipótese lançada por MORENO e CHRISPEELS (1989) sobre a existência de um único gene que codificasse as proteínas dos IAs.

Uma outra teoria lançada por MORENO e CHRISPEEL (1989) sobre a similaridade dos IAs com as lectinas também não pode ser confirmada através da hidrofobicidade superficial das moléculas. Os resultados aqui apresentados são cerca de 50 vezes inferiores aos de lectinas de feijão (DATTA et al. 1990). Além disso, deve-se considerar que a metodologia empregada não utiliza a concentração molar das proteínas nos cálculos, mas a massa protéica. Portanto, se ainda forem realizadas as devidas transformações, a hidrofobicidade superficial por mol de lectinas torna-se 100 vezes superior à dos IAs.

Devido a possibilidade de interação dos inibidores com moléculas hidrofóbicas, também está sendo investigada em nosso laboratório a relação existente entre os IAs, de alguns cereais, e as proteínas transportadoras de fosfolipídeos, (PLTP) encontradas em vários órgãos de diversos vegetais. O interesse neste novo assunto começou a partir da confrontação de seqüências de amino ácidos dos inibidores do milheto e da cevada em banco de genes, onde se tornou evidente a conservação de 15 resíduos em PLTP de mamona (*Ricinus comunis*), espinafre (*Spinacea oleracea*) e lágrimas de Jó (*Coix lacrima-jobi*) (TROYANO PUEYO et al, 1990).

Pelos resultados apresentados e pelos dados de literatura citados, é possível supor que os inibidores de α -amilase possam ter um papel fisiológico no mecanismo de transporte de moléculas anfifílicas ou lipofílicas. Não se excluindo, entretanto, a possibilidade deles atuarem também como defesas ao ataque de insetos.

5.2.6. Mapas Trípticos

A caracterização de proteínas através de mapas peptídicos tem sido utilizada na identificação de fragmentos semelhantes em duas ou mais proteínas. A revelação final desse mapas pode ser realizada por cromatografia e eletroforese bidimensionais, porém ultimamente a cromatografia em HPLC tem permitido uma alta resolução dos peptídeos hidrolisados.

Para a realização dos mapas trípticos dos IAs neste trabalho, as proteínas foram dissociadas em SDS, uréia e β -mercaptoetanol, dialisadas, liofilizadas e digeridas com tripsina. Após a hidrólise tríptica, o material foi cromatografado em FPLC, através de coluna de Mono Q e em coluna de TMS 250, em HPLC.

As cromatografias dos peptídeos em Mono Q foram realizadas apenas no I-2, para efeito comparativo com inibidores de outros feijões (Fig. 11). O objetivo do ensaio era tentar criar uma identidade aos inibidores de cada cultivar estudada. Os resultados não foram plenamente satisfatórios devido à baixa resolução alcançada na separação. No entanto, nota-se que o I-2 do Rico 23 se assemelha ao I-2 do outro feijão preto estudado por YIN (1990)³ e ambos distinguem-se do IA do feijão branco (HO, 1990)³. Deve-se ressaltar a forma intermediária dos picos do I-1, porém mantendo os picos gêmeos característicos do feijão preto.

O mapa peptídico obtido por HPLC em coluna de C-2, TMS 250, teve melhor resolução dos picos (Fig. 12). Através da cromatografia de fase reversa foi possível identificar o perfil tríptico de cada inibidor, com no mínimo 17 picos que estariam de acordo com o número de resíduos de Lys e Arg. No entanto, seria prematuro afirmar a existência de peptídeos iguais em ambas proteínas, pois para tanto deveríamos identificar ao menos os amino ácidos NH_2 -terminais, bem como sua completa composição.

³ - Resultados não publicados

Figura 11. Mapa tríptico comparativo dos inibidores de α -amilase. Cromatografia em coluna de troca iônica, Mono Q, após hidrólise enzimática dos inibidores 1 e 2 do feijão preto de YIN (a e b), do I-2 do feijão preto Rico 23 (c), do feijão branco de HO (d), e do solvente (e) (YIN et al. 1990).

Figura 12. Mapa trípico dos inibidores em coluna de TMS-250. Os hidrolisados de tripsina dos IAs do feijão Rico 23 foram cromatografados em coluna de fase reversa em gradiente de TFA/acetonitrila. a. I-1; b. I-2; c. controle, somente com enzima; d. solvente.

5.3. Condições de Dissociação Molécular

Conforme os primeiros relatos sobre a estrutura química (POWERS e WHITAKER, 1977a e LAJOLO e FINARDI FILHO, 1985), os inibidores de α -amilase possuem de 2 a 4 cadeias peptídicas formando uma estrutura quaternária. A ruptura de tais estruturas ocorre na presença de agentes dissociantes com emprego de temperaturas elevadas. Apesar da perda de atividade antiamilásica, a dissociação das moléculas dos inibidores torna-se essencial para o estudo de seus aspectos estruturais, principalmente no que se refere aos tipos e à estabilidade das ligações químicas envolvidas, ao número de subunidades, à conformação espacial, e à localização de sítios de interação com as enzimas.

Serão focalizados a seguir alguns parâmetros relativos à dissociação dos inibidores, necessários para a melhor compreensão de seus comportamentos e como etapa preliminar para a obtenção dos peptídeos isolados.

5.3.1. Agentes Químicos e Temperatura

Seguindo o modelo anteriormente descrito (LAJOLO e FINARDI FILHO, 1985), os IAs purificados foram submetidos a soluções contendo SDS 1%, uréia 6M e β -mercaptoetanol 1%. Foram realizados dois ensaios nas condições descritas: num deles variou-se a temperatura de aquecimento, para um tempo fixo de 3 min, e no outro a variável foi o tempo, empregando-se a temperatura de ebulição. A condição ideal de dissociação das subunidades, em relação a esses dois parâmetros, foi acompanhada por SDS-PAGE (Fig. 13 e 14).

Pela análise das figuras 13 e 14 pode-se comprovar a labilidade dos IAs à ação de agentes dissociantes. Mesmo a 0°C, cerca de 40% da estrutura do I-2 já se encontra dissociada, e com 3 min de tratamento a 60°C toda molécula se dissocia. Na curva de tempo de aquecimento a 100°C, 30 seg de tratamento são suficientes para a dissociação completa da molécula.

Assim como a dissociação do I-2 descrita em trabalho anterior (LAJOLO e FINARDI FILHO, 1985), o inibidor I-1 também se dissocia na presença de SDS e uréia, mesmo a baixas temperaturas. A explicação

Figura 13. Influência da temperatura sobre a dissociação dos inibidores. SDS-PAGE com 10% de monômero, corrida a 15 °C e 10 mA; faixas de 1 a 5 para o I-1, e de 6 a 10 para o I-2. Tratamentos prévios: controle, 0 °C (1 e 6); 40 °C (2 e 7); 60 °C (3 e 8); 80 °C (4 e 9); 100 °C (5 e 10).

Figura 14. Influência do tempo de aquecimento sobre a dissociação dos inibidores. As mesmas condições de corrida anteriormente citadas, com os seguintes tratamentos: controle, 0 °C (1 e 6); aquecimento a 100 °C por 30 seg (2 e 7), 1 min (3 e 8), 2 min (4 e 9) e 3 min (5 e 10).

para tal fato se deve às características das ligações de baixa energia, eletrostáticas, hidrofóbicas e dipolo-dipolo, responsáveis pela manutenção da estrutura dos inibidores. Os atuais resultados confirmam os dados cinéticos de perda de atividade na presença de isopropanol, que diminui a constante dielétrica do meio, com conseqüente alteração conformacional (WHITAKER et al, 1988).

5.3.2. Denaturação Térmica

A metodologia de calorimetria diferencial de varredura (DSC) tem sido empregada na caracterização de proteínas para determinar o ponto de denaturação térmica, as mudanças estruturais, e a entalpia de cada processo. No caso dos IAs foi testada a influência de dois parâmetros, pH e concentração de uréia, na denaturação térmica.

Os tampões escolhidos para o primeiro experimento, tiveram como base o pH próximo da precipitação isoeletrica da preparação antiga (4,8), os pontos ótimos de inativação das enzimas pancreática (5,4) e salivar (6,9), e ainda o TFP utilizado na maioria dos experimentos aqui descritos (7,6).

Os resultados da variação de pH mostram, em parte, dois comportamentos paralelos entre os IAs (Fig. 15), ou seja, não houve alterações significativas das temperaturas de denaturação nos meios testados entre pH 5,4 e 7,6. O I-2 apresentou sua denaturação térmica ao redor de 89°C, nos quatro pontos experimentais, enquanto o I-1 situou-se em 73°C, em três valores de pH.

Apenas em pH 4,8, o I-1 apresentou uma acentuada elevação na temperatura de denaturação, indicando um possível aumento em sua estabilidade térmica nas condições de ensaio. Convém destacar que a relação massa protéica/tampão em cada determinação foi da ordem de 2mg em 10 μ l, portanto muito superior às condições de preparação ou de ensaio de atividade dos inibidores. Uma possível explicação para esse comportamento seria a ionização da molécula formando aglomerados mais resistentes à denaturação.

No segundo sistema analisou-se a influência das concentrações crescentes de uréia sobre a temperatura de denaturação dos IAs (Fig. 16).

Figura 15. Denaturação térmica em DSC em função do pH. Os valores dos picos de denaturação térmica dos inibidores foram relacionados com o pH das suspensões protéicas.

Figura 16. Denaturação térmica em DSC em função da concentração de uréia. Utilizada a mesma sistemática da figura anterior.

Os resultados revelam que o I-2 não sofre influência da concentração de uréia na sua denaturação térmica, mantendo-se na faixa dos 90°C. Porém, o I-1 é denaturado a 74°C no ensaio controle, sem uréia, e a 67°C com 6M de uréia.

Os resultados de DSC mostram principalmente as diferenças de comportamento entre os IAs, que explicam as perdas ocorridas nas preparações que empregavam aquecimento, como forma de denaturar enzimas proteolíticas e amilolíticas. Mostram ainda que a uréia, nas condições de alta concentração de proteína, afeta apenas a denaturação do I-1, comprovando sua maior labilidade.

5.3.3. Pesos Moleculares das Sub-Unidades

A partir das eletroforeses em SDS foram determinados os pesos moleculares das sub-unidades dos IAs (Fig.17). Os inibidores do feijão Rico 23 apresentam peptídeos ao redor de 19 KDaltons, para o I-1, e 17 KDaltons, para o I-2.

Para efeito de comparação, os inibidores de outro feijão preto possuem sub-unidades de 13 e 17,5 Kdaltons (YIN et al, 1990), compatíveis com os dados aqui apresentados. Entretanto, o inibidor da cultivar Greensleeves, revela ter dois tipos de sub-unidades de 8,7 e 23 KDaltons (MORENO e CHRISPEELS, 1989), parecendo se tratar de outro tipo de inibidor. Para explicar esse resultado os autores sugeriram a ação de uma protease que cindiria a molécula após a tradução.

Contudo, não houve correspondência entre esses resultados e ao apresentados pelos IAs do feijão Rico 23. Em nenhuma corrida eletroforética realizada foi detectado qualquer peptídeo com peso molecular inferior a 15 KDaltons.

5.3.4. Mudanças Conformacionais em Condições Dissociantes

Prosseguindo os estudos de dissociação, submetemos os IAs a tratamento com uréia e avaliamos as mudanças conformacionais, segundo VAN DEN OETELAAR e HOENDERS (1989). O método baseia-se na ruptura da configuração terciária das moléculas, acarretando uma

exposição maior dos resíduos de triptofano ao meio externo. Em consequência, há um ligeiro aumento no comprimento de onda de emissão de fluorescência, permitindo assim estabelecer a concentração crítica de uréia necessária para a mudança conformacional.

Inicialmente, são apresentados os espectros de emissão de fluorescência dos IAs nativos (Fig. 18). Ao serem excitados a 280nm, os inibidores emitem espectros extremamente semelhantes, possibilitando a padronização da concentração protéica, da sensibilidade e da fenda durante os ensaios de ambos.

A figura 19 mostra os resultados do experimento acima descrito. Nota-se que mesmo a baixas concentrações de uréia (0 - 1,2M) ocorrem pequenos deslocamentos no comprimento de onda de emissão. Houve a formação de um patamar ligeiramente superior, em relação ao nível inicial, que pode significar uma mudança estrutural intermediária e relativamente estável.

A partir de 2M de uréia, para o I-1, e 2,5M, para o I-2, houve uma efetiva abertura da conformação molecular de ambas proteínas. Porém, com o aumento da concentração de uréia as dissociações tornam-se distintas, com o I-1 demonstrando maior suscetibilidade ao tratamento. No entanto, após 3,6M as curvas seguem juntas novamente, indicando o final do processo dissociativo.

5.3.5. Reversibilidade das Proteínas Dissociadas

No experimento anterior, os pontos extremos de concentração de uréia corresponderam às formas nativa e dissociada dos IAs. Os pontos intermediários de dissociação podem ser considerados 2,6 e 3,4M, respectivamente para o I-1 e I-2. No entanto, esse sistema não permitiu verificar a reversibilidade da dissociação, ou ainda, como o processo interfere na atividade inibidora.

Baseado no mesmo sistema, foi desenvolvido um novo experimento com apenas os pontos médios e extremos de dissociação de cada inibidor. Foram comparadas duas leituras fluorimétricas, tomadas na presença de uréia e após a sua remoção por diálise (Fig. 20). Os resultados mostraram que após a mudança de conformação, a remoção

Figura 17. Pesos moleculares das sub-unidades. SDS-PAGE dos IAs em gel de 12,5 % de monômero.

Figura 18. Espectro de emissão de fluorescência. Soluções dos IAs nativos, 20 $\mu\text{g/ml}$, foram excitadas a 280 nm, variando-se o comprimento de onda de emissão.

Figura 19. Mudanças conformacionais em função da concentração de uréia. Foram registrados os pontos máximos de emissão de fluorescência de soluções de 20 $\mu\text{g/ml}$ de IAs na presença de uréia.

Figura 20. Reversibilidade conformacional. Três pontos dos experimentos da fig. 19 foram retomados, dialisados e reanalisados, mostrando a reversibilidade da conformação protéica.

do agente dissociante reduz o comprimento de onda de emissão. As moléculas excitadas a 280nm voltam a emitir energia em comprimentos de onda próximos do controle.

Tais mudanças, entretanto, não significaram a reversibilidade da estrutura protéica, mas apenas uma reassociação aleatória. Este fato foi confirmado através da atividade residual de inibição de α amilase e da estabilidade da solução: os ensaios com uréia tiveram atividade nula e precipitação da proteína.

A inativação dos inibidores nas concentrações intermediárias de uréia sugere que as moléculas, mesmo não estando totalmente dissociadas, perdem sua capacidade de interação com a enzima. Ou seja, a ligação dos IAs com as enzimas é dependente da estrutura quaternária.

5.4. Separação das Sub-Unidades

Os IAs dissociados foram submetidos a vários sistemas cromatográficos, como em Superose 12, Mono S, Mono Q e Polybuffer Exchanger na tentativa de separação das sub-unidades. Em cada meio foram mantidas as condições adequadas das resinas recomendadas pelos fabricantes, porém elas não foram eficientes, seja na separação, ou na reprodutibilidade dos resultados.

Partiu-se então para um sistema em coluna de DEAE-celulose, com TFP e 6M de uréia, com aplicação de um gradiente de 0 a 0,5M de NaCl. Os inibidores apresentaram perfis de separação semelhantes com três picos de eluição (Fig. 21 e 22), variando apenas a proporção entre eles.

As análises em PAGE (Fig. 23 e 24) mostram que os primeiros picos de ambas separações são constituídos por bandas protéicas de pesos moleculares elevados, com menor mobilidade em relação aos demais. Essas proteínas podem ser consideradas como contaminantes, como proteínas não dissociadas, ou ainda, como produto de polimerização dos IAs durante o tratamento. Estas hipóteses foram reforçadas pela revelação de cerca de 15 pequenas bandas através de

Figura 21. Cromatografia em DEAE-celulose/uréia do I-1. Uma amostra de 2 mg foi dissociada em SDS-uréia-mercaptoetanol e cromatografada em uréia 6M em TFP. Após o primeiro pico foi aplicado um gradiente de NaCl para a eluição dos demais. As barras horizontais indicam as frações reunidas.

Figura 22. Cromatografia em DEAE-celulose/uréia do I-2. As condições de separação foram idênticas às anteriores.

Figura 23. Eletroforese dos peptídeos isolados do I-1. SDS-PAGE dos picos resultantes da fig. 21 em gel de 12,5% de monômero.

Figura 24. Eletroforese dos peptídeos isolados do I-2. SDS-PAGE dos picos resultantes da fig. 22 em gel de 12,5% de monômero.

AgNO₃, que não foram detectadas pela revelação normal com Coomassie R⁴.

Os dois picos eluidos por gradiente de NaCl mostraram duas bandas protéicas homogêneas e distintas em PAGE (Fig. 23 e 24), com pesos moleculares em torno de 17.000 Daltons. O pico 3 do I-2, no entanto, apresentou-se com baixo rendimento e coloração parda, após liofilizado, o que poderia significar uma associação com pigmentos. Nesse caso, o pico de absorção seria causado pelos compostos fenólicos dos pigmentos.

Conhecendo-se agora o maior grau de hidrofobicidade do I-2, pode-se inferir que essa possível associação proteína-pigmento tenha resistido a todas etapas de purificação, sendo rompida apenas na presença de uréia 6M. Além disso, o pigmento ficou retido em DEAE-celulose, assim como na fase preparativa, nas mesmas condições de força iônica e pH do tampão. Nos dois casos os pigmentos foram eluidos somente em concentração superior a 0,3M de NaCl.

Apesar de conhecidas e separadas as sub-unidades dos IAs, ainda resta a dúvida quanto à proporção de cada sub-unidade na composição molecular.

5.5. Caracterização das Sub-Unidades

A caracterização das sub-unidades foi realizada através do seqüenciamento de alguns peptídeos isolados na etapa anterior. Devido ao rendimento heterogêneo desses peptídeos, a seqüência de amino ácidos foi determinada somente em duas frações peptídicas, correspondentes ao pico II em ambos inibidores. A escolha dessas frações se prendeu ao fato de serem aquelas de maior rendimento após a remoção da uréia e a liofilização. Os resultados estão expressos na tabela 6.

Foi somente através do seqüenciamento que verificou-se a contaminação do I-2 com dois de seus peptídeos presentes. Deve-se ressaltar também que houve uma falha no sistema automático de

⁴ - Resultados não incluídos

TABELA 6 - Sequência de amino ácidos dos peptídeos do I-1 e do I-2.

NÚMERO DE CICLOS	INIBIDOR I		INIBIDOR II	
	Resíduo Identificado	p mol	Resíduo Identificado	p mol
1	Ala/Ser/Val	1912/825/372	Ala/Ser/X	3548/2429
2	Glu	344	Ala/Thr	2947/1388
3	Thr	351	Glu/Val	2508/1399
4	X	X	Gly/Thr	2194/1168
5	Phe/Asn	392/223	Leu/Ser	2026/578
6	Phe	227	Phe/Asp	2285/1452
7	Ile/Val	185/125	Phe/Asn	2607/1411
8	Blank	--	Ile/Aa/Arg	935/
9	Blank	--	Leu/Asp	1898/1358
10	Blank	--	Gly/Val	1566/1141
11	Blank	--	Phe/Pro	1771/837
12	Blank/Gly		Val/His	833/602
13	Lys	197	Lys/Gln	2120/1149
14	Asp	298	Thr/Pro	677/626
15	Leu	350	Asn/Glu	1200/812
16	Leu/Ile	432/310	Leu/Ser	1253/248
17	Ile	395	Lys/Ile	1048/592
18	Gln	234	Leu/Gly	1217/705
19	Gln	305	Gln/Asp	953/606
20	Gly	352	Gly/Thr	1127/331
21	Ala	319	Asp/Pro	886/316
22	Ala	391	Ala/Thr	958/327
23	Val	446	Ile/Aa/Arg	418
24			Val/Glu	727/334
25			Phe/Ser	567/202
26			Asp/	607
27			Asn/Thr	555/240
28			Phe/Gly	565/536
29			Asn/Leu	586/359
30			Leu/Ser	666/142
31			Gln	349
32			Leu	547
33			Ser	171
34			Tyr	363
35			Asn	363

detecção durante a operação do seqüenciador, aparecendo X no local correspondente.

Os segmentos aqui determinados foram alinhados com a seqüência deduzida do DNA da cultivar Greensleeves (MORENO e CHRISPEELS, 1989), mostrando alto grau de homologia (Fig. 25). É importante salientar que a homologia atinge 59% entre o DNA e as frações I-1A e I-2B, caindo para 41% entre os segmentos I-1A e I-2A e zero entre o I-1A e o I-2B (Tabela 7).

No entanto, apesar dos peptídeos se mostrarem semelhantes, pode-se deduzir que os segmentos I-1A e I-2A sejam traduzidos a partir de DNAs diferentes, não obstante a conservação de alguns amino ácidos na seqüência, não ficou caracterizada uma região de total identidade. Os resultados confirmam a hipótese inicial de diferenças estruturais marcantes, que fora aventada na discussão da hidrofobicidade das moléculas. Em 1987, GARCIA OLMEDO et al. levantaram a mesma possibilidade de síntese protéica dos iso-inibidores do trigo, com menos de 40% de homologia, a partir de DNAs diferentes, que seriam derivados de um ancestral comum.

Portanto, a teoria de síntese dos IAs a partir de um único DNA, com modificações pós-translacionais, formulada por MORENO e CHRISPEELS (1989) torna-se improvável. Os autores certamente trabalharam com apenas um dos inibidores generalizando os resultados obtidos.

As modificações pós-translacionais a nível citoplasmático, ou ainda, um artefato de técnica através de proteólise durante a purificação, podem ser viáveis quando se considera apenas uma proteína e seu correspondente DNA. Porém, torna-se difícil admitir que dois peptídeos sintetizados pelo mesmo código genético tenham alterações estruturais aleatórias em mais de 50% da molécula, como são os peptídeos I-1A e I-2A (Tabela 7).

Entretanto, os resultados acima apontam para uma nova família de inibidores de α -amilase, independente dos demais inibidores de outras espécies vegetais. Dentre todas amostras de *P. vulgaris* estudadas, torna-se evidente a baixa dispersão dos dados em cada parâmetro. Esses mesmos resultados que há alguns anos pareciam ser discrepantes, hoje

	20									30										40	
cDNA	HIS	ALA	ASN	SER	<u>ALA</u>	THR	<u>GLU</u>	<u>THR</u>	SER	<u>PHE</u>	ILE	<u>ILE</u>	ASP	ALA	<u>PHE</u>	ASN	<u>LYS</u>	ILE	<u>ASN</u>	<u>LEU</u>	<u>ILE</u>
I-1					<u>ALA</u>	---	<u>GLU</u>	<u>THR</u>	X	<u>PHE</u> ASN	<u>PHE</u>	<u>ILE</u> VAL	X	X	X	X	X	LYS	ASP	<u>LEU</u>	<u>LEU</u> <u>ILE</u>
I-2 A					<u>ALA</u>	---	ALA	<u>GLU</u>	GLY	<u>LEU</u>	<u>PHE</u>	<u>ILE</u>	LEU	<u>GLY</u>	<u>PHE</u>	VAL	<u>LYS</u>	THR	<u>ASN</u>	<u>LEU</u>	LYS
	41									50										60	
cDNA	<u>LEU</u>	<u>GLN</u>	<u>GLY</u>	<u>ASP</u>	<u>ALA</u>	THR	<u>VAL</u>	SER	SER	<u>ASN</u>	GLY	<u>ASN</u>	<u>LEU</u>	<u>GLN</u>	<u>LEU</u>	<u>SER</u>	<u>TYR</u>	MET	SER	TYR	
I-1	<u>ILE</u>	<u>GLN</u>	GLN	GLY	<u>ALA</u>	ALA	<u>VAL</u>														
I-2 A	<u>LEU</u>	<u>GLN</u>	<u>GLY</u>	<u>ASP</u>	<u>ALA</u>	ILE	<u>VAL</u>	PHE	ASP	<u>ASN</u>	PHE	<u>ASN</u>	<u>LEU</u>	<u>GLN</u>	<u>LEU</u>	<u>SER</u>	<u>TYR</u>	ASN			
	100									110										120	
cDNA	ASN	<u>SER</u>	ALA	<u>VAL</u>	GLY	LEU	<u>ASP</u>	PHE	VAL	LEU	<u>VAL</u>	<u>PRO</u>	VAL	<u>GLN</u>	<u>PRO</u>	<u>GLU</u>	<u>SER</u>	LYS	<u>GLY</u>	<u>ASP</u>	<u>THR</u>
I-2 B		<u>SER</u>	THR	<u>VAL</u>	THR	SER	<u>ASP</u>	ASN	ARG	ASP	<u>VAL</u>	<u>PRO</u>	HIS	<u>GLN</u>	<u>PRO</u>	<u>GLU</u>	<u>SER</u>	ILE	<u>GLY</u>	<u>ASP</u>	<u>THR</u>
									HIS												
	121									130											
cDNA	VAL	<u>THR</u>	VAL	<u>GLU</u>	PHE	ASP	<u>THR</u>	PHE	<u>LEU</u>	<u>SER</u>	ARG	ILE	SER	ILE							
I-2 B	PRO	<u>THR</u>	ARG	<u>GLU</u>	SER	X	<u>THR</u>	GLY	<u>LEU</u>	<u>SER</u>											
							HIS														

Figura 25. Alinhamento dos peptídeos seqüenciados dos inibidores de α -amilase do feijão preto com a deduzida do cDNA da cv. Greensleaves. a. A numeração indica a posição dos resíduos da cv. Greensleaves. c. Os resíduos sublinhados mostram a homologia existente entre as cadeias. b. Os resíduos duplamente sublinhados mostram a similaridade dos amino ácidos substituídos em relação às outras cadeias. d. X - resíduos não determinados. e. --- não há resíduo no local, artifício usado para efeito de alinhamento. f. a presença de dois resíduos na mesma posição significa resultado duvidoso.

TABELA 7 Homologia entre as seqüências dos peptídeos dos IAs do feijão preto cv. Rico 23 e a decodificada do cDNA da cv. Greensleeves (MORENO E CHRISPEELS, 1989). Os valores expressam a percentagem de resíduos homólogos a partir do alinhamento dos peptídeos da figura 25.

Peptídeos	I-1	I-2A	I-2B
cDNA	59	53	59
I-1	--	41	0
I-2A	41	--	0

podem ser considerados normais dentro de uma única espécie, devido ao grande número de variedades e cultivares conhecidas.

6. CONCLUSÕES

A análise dos resultados apresentados sobre os inibidores de α -amilase do feijão preto, cv. Rico 23, e os dados relativos aos inibidores de demais variedades de feijão e de outras espécies, compilados durante a execução deste trabalho, permitem concluir que:

- 1- Pelas suas características químicas de conteúdo de carboidratos, ponto isoelétrico, peso molecular, composição de amino ácidos, mapas trópticos, hidrofobicidade superficial, comportamento eletroforético, e padrão semelhante de dissociação pela ação de uréia, o I-1 e o I-2 demonstram ser isoinibidores estruturalmente semelhantes. Em ambos, a conformação tridimensional das moléculas parece ser mantida por ligações de baixa energia, do tipo dipolo-dipolo, interações hidrofóbicas e eletrostáticas e pontes de hidrogênio, rompendo-se a baixas temperaturas em meio contendo uréia, sem necessitar da presença de agentes redutores.
- 2- As estruturas protéicas dos inibidores de α -amilase são diferentes entre si a nível de seqüência primária, apesar da homologia de 41%, devendo ser codificados por DNAs diferentes.
- 3- As semelhanças estruturais comprovadas pelo seqüenciamento dos peptídeos, e por comparação com a da variedade Greensleaves, apontam para um DNA ancestral comum.
- 4- Os inibidores de α -amilase dos feijões não têm semelhanças estruturais com moléculas de outras espécies vegetais, devendo ser considerados como uma nova família dessas proteínas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ABDUL-HUSSAIN, S. & PAULSEN, G.M. Role of proteinaceous α -amylase enzyme inhibitors in preharvest sprouting of wheat grain. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, **37**:295-299, 1989.
- ADAMS, M.W.; COYNE, D.P.; DAVIS, J.H.C.; GRAHAM, P.H.; FRANCIS, C.A. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In Summerfield, R.J. & Roberts, E.H. eds. **Grain Legume Crops**, London, Collins, p. 433-476., 1985.
- ALTABELLA, T. & CHRISPEELS, M. Tobacco plants transformed with the bean α ai gene express an inhibitor of insect α -amylase in their seeds. **Plant Physiol.**, Bethesda, **93**:805-810, 1990.
- ANDREWS, P. Estimation of the molecular weight of proteins by Sephadex gel-filtration. **Biochem. J.**, London, **91**:222-233, 1964.
- ANDRIOLO, S.; ROUANET, J.-M.; LAFONT, J.; BESANÇON, P. Inactivation of phaseolamin, an α -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris* by Gastric acid and digestive proteases. **Nutr. Rep. Int.**, Los Altos, **29**:149-156, 1984.
- ARY, M.B.; RICHARDSON, M.; SHEWRY, P.R. Purification and characterization of an insect α -amylase inhibitor/endochitinase from seeds of Job's Tears. (*Coix lachryma-jobi*). **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, **999**:260-266, 1989.
- BEDETTI, C.; BOZZINI, A.; SILANO, V.; VITTOZZI, L. Species amylase protein inhibitors and the role *Aegilops* in poloploid wheat speciation. **Biochem.Biophys.Acta**, Amsterdam, **962**:299-307, 1974.

*De acordo com a Norma NB66/78 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI), 1990.

- BERGLUND-BRÜCHER, O. & BRÜCHER, H. The south american wild bean (*Phaseolus aborigineus* Burk.) as ancestor of the common bean. **Econ. Bot.**, New York, **30**:257-272, 1976.
- BLANCO-LABRA, A. & ITURBE-CHIÑAS, F.A. Purification and characterization of an α -amylase inhibitor from maize (*Zea mize*). **J. Food Biochem.**, Westport, **5**:1-17, 1981.
- BLOCH JUNIOR, C. & RICHARDSON, M. Purification and aminoacid sequence of five α -amylase inhibitors from *Sorghum bicolor* seeds. **Int. Symp. on Crystallography and Molecular Biology**, Guarujá, 5-9 Nov., 1990.
- 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**:1413-1416, 1982.
- BOWMAN, D.E. Amylase inhibitor in navy beans. **Science**, Washington, **102**:2649-2650, 1945.
- BUONOCORE, V. & SILANO, V. Biochemical, Nutritional and toxicological aspects of alpha-amylase inhibitors from plant foods. **Adv. Exp. Med. Biol.**, New York, **199**:483-507, 1986.
- BUONOCORE, V.; DE BIASI, M.-G.; GIARDINA, P.; POREIO, E.; SILANO, V. Purification and properties of an α -amylase tetrameric inhibitor from wheat kernell. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, **831**:40-48, 1985.
- BUTLER, L.G. New perspectives on the antinutritional effects of tannins. In: Kinsella, J.E. e Soucie, W.G., eds. **Food Proteins**, AOAC, Champaign, 1989, p. 402-409.

- CAMPOS, F.A.P. & RICHARDSON, M. The complete aminoacid sequence of the bifunctional alpha-amylase/trypsin inhibitor from seeds of ragi. **FEBS Lett.**, Amsterdam, **152**:300-303, 1983.
- CASCUDO, L.C. Elementos básicos. a) O binômio feijão e farinha. In Cascudo, L.C., **História da Alimentação no Brasil**, Ed., Univ.S.Paulo, V.2, pp 489-509, 1983.
- CHZASZCS, T. & JANICKI, J. "Sisto-Amylase", ein natürlicher Paralysator der Amylase. **Biochem.Z.**, Berlin, **260**:354-368, 1933.
- CHZASZCS, T. & JANICKI, J. The inactivation of animal amylase by plant paralyzers and the presence of inactivating substances in solutions of animal amylase. **Biochem.J.**, London, **28**:296-304, 1934.
- CINCO, F.J.; FRELS, J.M.; HOLT, D.L.; RUPNOW, J.H. Determination of the number and heat stability of α -amylase inhibitors in white and red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). **J. Food Sci.**, Chicago, **50**:533-534, 1985.
- DATTA, P.K.; FIGUEROA, M.O.R.; LAJOLO, F.M. Hydrophobic binding properties of pinhão, *Araucaria brasiliensis*, seed lectins (enviado para publicação, **Plant. Physiol.**, 1990).
- DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II - Method and application to human serum proteins. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, **121**:404-427, 1964.
- DePONTE, R.; PARLAMENTI, R.; PETRUCCI, T.; SILANO, V.; TOMASI, M. Albumin α -amylase inhibitor families from wheat flour. **Cereal Chem.**, St.Paul, **53**:805-820, 1976.
- DOJCZEW, D.; ANDRZEJCZUK-HYBEL, J.; KACZKOWSKI, J. The protein inhibitors of amylases and peptidases isolated from cereal grains. **Nahrung**. Berlin, **30**:275-279, 1986.

- DuBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; SMITH, F. Colorimetric method of determination of sugar and related substance. **Anal. Chem.**, Easton, **28**:350-356, 1956.
- EDMAN, P. & BEGG, G. A protein sequenator. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, **1**:80-91, 1967.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAO Statistics Series**. Nº 88, 1988, Roma.
- FINARDI FILHO, F. Parâmetros estruturais do inibidor de α -amilase de feijão (*Phaseolus vulgaris*). São Paulo, 63p. 1983. | Dissertação de Mestrado - Fac.Ciênc. Farmacêuticas - Univ.S.Paulo | .
- FINARDI FILHO, F. & LAJOLO, F.M. Identificação eletroforética de inibidor de α -amilase em géis de poliacrilamida-amilopectina. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, **2**:21-32, 1982.
- FRELS, J.M. & RUPNOW, J.H. Characterization of two α -amylase inhibitors from black bean (*Phaseolus vulgaris*). **J. Food Sci.**, Chicago, **50**:72-77, 1985.
- FRELS, J.M. & RUPNOW, J.H. Purification and partial characterization of two α -amylase inhibitors from black bean (*Phaseolus vulgaris*). **J. Food Biochem.**, Westport, **8**:281-301, 1984.
- FROMMER, W.; JUNGE, B.; MÜLLER, L.; SCHMIDT, D.; TRUSCHEIT, E. Neue Enzyminhibitoren aus Mikroorganismen. **Planta Med.**, Stuttgart, **35**:195-217, 1979.
- FUKUHARA, K.; MURAI, H.; MURAO, S. Isolation and structure-activity relationship of some amylostatis (F-1b Fraction) produced by *Streptomyces diastaticus* subsp. *Amylostaticus* Nº 9410. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, **46**:1941-1945, 1982a.

- FUKUHARA, K.; MURAI, H.; MURAO, S. Amylostatins, other amylase inhibitors produced by *Streptomyces diastaticus* subsp. *Amylostaticus* N^o 2476. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, **46**:2021-2030, 1982b.
- GALLAHER, D. & SCHNEEMAN, B.O. Nutritional and metabolic response to plant inhibitors of digestive enzymes. **Adv. Exp. Med. and Biol.**, New York, **199**:167-184, 1986.
- GARCIA-LOPEZ, J.S.; ERDMAN Jr., J.W.; SHERMAN, A.R. Iron retention by rats from casein-legume test meals: effect of tannin level and previous diet. **J. Nutr.**, Bethesda, **120**:760-766, 1990.
- GARCIA-OLMEDO, F.; SALCEDO, G.; SANCHEZ-MONGE, R.; GOMEZ, L.; ROYO, J.; CARBONERO, P. Plant proteinaceous inhibitor of proteinases and α -amylases. **Oxford Surv. Plant Mol.Cell Biol.**, Oxford, **4**:275-334, 1987.
- GRANUM, P.E. Purification and characterization of an α -amylase inhibitor from rye (*Secalè cereale*) flour. **J. Food Biochem.**, Westport, **2**:103-120, 1978.
- GRANUM, P.E. & ESKELAND, B. Nutritional significance of α -amylase inhibitor from wheat. **Nutr. Rep. Inter.**, Los Altos, **23**:155-162, 1981.
- HEMBERG, T. & LARSSON, I. Inhibitor β -complex from resting potato tubers as an inhibitor of α -amylase. **Physiol.Plant.**, Copenhagen, **14**:861-867, 1961.
- 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.
- IBGE - Secretaria de Planejamento e Coordenação da Presidência da República - Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal**. Rio de Janeiro, V. 12, 1987.

- IDA, E.J. Purificação e caracterização parcial dos inibidores de α -amilase do triticle (*Triticum X Secale*). São Paulo, 84p., 1986. |Tese de doutorado - Fac.Ciênc.Farmacêuticas - Univ.S.Paulo|.
- IGUTI, A. & LAJOLO, F.M. Isolation and purification of the α -amylase isoinhibitors from beans (*P.vulgaris*). **J. Food Biochem.**, (enviado para publicação) 1990.
- IGUTI, A.M. Isolamento a purificação de isoinibidores de α -amilase em diferentes variedades de feijões (*Phaseolus vulgaris*). S.Paulo, 68p., 1988. |Dissertação de Mestrado - Fac.Ciênc.Farmacêuticas - Univ.S.Paulo|.
- IRSHAD, M. & SHARMA, C.B. Purification and properties of an α -amylase protein-inhibitor from *Arachis hypogaea* seeds. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, **659**:326-333, 1981.
- 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**:1424-1428, 1981.
- KAPLAN, L. Archeology and domestication in American *Phaseolus* (beans). **Econ. Bot.**, New York, **19**:358-368, 1965.
- KAPLAN, L.; LYNCH, T.F.; SMITH, C.E., Jr. Early cultivated bean (*Phaseolus vulgaris*) from an intermontane Peruvian valley. **Science**, Washington, **179**:76-77, 1973.
- KATO, A. & NAKAI, S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. **Biochim.Biophys.Acta**, Amsterdam, **624**:13-20, 1980.

- KLINE, A.D.; BRAUN, W.; WÜTHRICH, K. Studies by ^1H -nuclear magnetic resonance and distance geometry of the solution conformation of the α -amylase inhibitor Tendamistat. **J. Mol. Biol.**, London, **189**:377-382, 1986.
- KNEEN, E. & SANDSTEDT, R.M. An amylase inhibitor from certain cereals. **J.Am.Chem.Soc.**, Washington, **65**:1247, 1943.
- KNEEN, E. & SANDSTEDT, R.M. Distribution and general properties of an amylase inhibitor in cereals. **Arch.Biochem.Biophys.**, New York, **9**:235-247, 1946.
- KOTARU, M.; KIMOTO, F.; YOSHIKAWA, H.; IKEUCHI, T. Changes of α -amylase inhibitory activity in kidney beans during heating and germination. **Nippon Shokuhin Kogyo bakkaishi**, Tokyo, **40**:240-243, 1987.
- KOTARU, M.; SAITO, K.; YOSHIKAWA, H.; IKEUCHI, T.; IBUKI, F. Purification and some properties of an α -amylase inhibitor from cranberry Bean. (*P. vulgaris*). **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, **51**:577-578, 1987.
- KUTTY, A.V.M. & PATTABIRAMAN, T.N. - Specificity of plant amylase inhibitors on ten pancreatic alpha amylases. **J.Food Biochem.**, Westport, **10**: 117-124, 1986.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, London, **227**:680-685, 1970.
- LAJOLO, F.M. **Inibidor de amilase do *Phaseolus vulgaris*: estudo bromatológico**. São Paulo, 133 p., 1977 Tese de livre-docência - Fac.Ciênc.Farmacêuticas - Univ.S.Paulo .
- LAJOLO, F.M. & FINARDI FILHO, F. Bean (*Phaseolus vulgaris*) amylase inhibitors. IFT Annual Meeting, Anaheim, 1990.

- LAJOLO, F.M. & FINARDI FILHO, F. Partial characterization of the amylase inhibitor of black bean (*Phaseolus vulgaris*), variety Rico 23. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, **33**:132-138, 1985.
- LAJOLO, F.M. & FINARDI FILHO, F. Purificação do inibidor de α -amilase do feijão preto (*Phaseolus vulgaris*) var. Rico 23. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, **4**:1-11, 1984.
- LAJOLO, F.M.; MANCINI FILHO, J.; MENEZES, E.W. Effect of a bean (*Phaseolus vulgaris*) α -amylase inhibitor on starch utilization. **Nutr. Rep. Int.**, Los Altos, **30**:45-54, 1984.
- LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W.; FILISETTI-COZZI, T.M.C.C. Considerações sobre carboidratos e fibra. **Arch.Latino Amer.Nutr.**, Caracas, **38**:519-542, 1988.
- LANFER-MARQUEZ, U.M. & LAJOLO, F.M. Composition and Digestibility of albumin, globulins and glutelins from *Phaseolus vulgaris*. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, **29**:1068-1074, 1981.
- LANFER-MARQUEZ, U.M. & LAJOLO, F.M. Natural values of cooked beans (*Phaseolus vulgaris*) and their isolated major protein fractions. **J. Sci. Food Agric.**, London, **53**:235-242, 1990.
- LIENER, I.E. The nutritional significance of lectins, In: Kinsella, J.E. & Soucie, W.G. eds., **Food Proteins**, AOCS, Champaign, 1989, p. 329-353.
- LIENER, I.E.; DONATUCCI, D.A.; TAREZA, J.C. Starch blockers: a potential source of trypsin inhibitors and lectins. **Am.J.Clin.Nutr.**, Bethesda, **39**:196-200, 1984.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. - Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, **193**:265-275, 1951.

- MAEDA, K.; KAKABAYASI, S.; MATSUBARA, H. Complete amino acid sequence of an α -amylase inhibitor in wheat kernel (O.19 - inhibitor). **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, **828**:213-221, 1985.
- MARSHALL, J.J. α -Amylase inhibitors from plants. In: JEANES, A. & HODGE, J. eds., **Physiological effects of food carbohydrates**. Washington, American Chemical Society, 1975. p. 244-266.
- MARSHALL, J.J. & LAUDA, C.M. Assay of α -amylase, inhibitor Activity in legumes. **Starke/Staerke**, Weinheim, **27**:274-278, 1975.
- 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**:8030-8037, 1975.
- MATOO, A.K. & MODI, V.V. Partial purification and properties of enzyme inhibitors from unripe mangoes. **Enzymologia**, Den Haag, **39**:237-247, 1970.
- MENEZES, E.W. & LAJOLO, F.M. Inhibition of starch digestion by a black bean α -amylase inhibitor, in normal and diabetic rats. **Nutr. Rep. Int.**, Los Altos, **36**:1185-1195, 1987.
- MORENO, J. & CHRISPEELS, M.J. A lectin gene encodes the α -amylase inhibitor of the common bean. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, **86**:7885-7889, 1989.
- MORENO, J.; ALTABELLA, T.; CHRISPEELS, M.J. Characterization of α -amylase-inhibitor, a lectin-like -protein in the seed of *Phaseolus vulgaris*. **Plant. Physiol.**, Bethesda, **92**:703-709, 1990.
- MUNDY, J.; HEJGAARD, J.; SUENDSEN, I. Characterization of a bifunctional wheat inhibitor of endogenous α -amylase and subtilisin. **FEBS Lett.**, Amsterdam, **167**:210-214, 1984.

- MUNDY, J.; SUENDSEN I.; HELJGAARD, J. Barley α -amylase/subtilisin inhibitor. I. Isolation and characterization. **Carlsberg Res. Commun.**, Copenhagen, **48**:81-90, 1983.
- MURAO, S.; GOTO, A.; MATSUI, Y.; OYAMA, K. New proteinous inhibitor (HAIM) of animal α -amylase from *Streptomyces griseosporus* YM-25. **Agric.Biol.Chem.**, Tokyo, **44**:1679-1681, 1980.
- MURAO, S.; OOUCHI, N.; GOTO, A.; ARAI, M. Isolation and identification of a pig pancreatic α -amylase inhibitor (Paim) producing *Streptomyces*. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, **49**:107-110, 1985.
- MURAO, S.; OOUCHI, N.; GOTO, A.; ARAI, M. New proteinaceous α -amylase inhibitor (Paim) from *Streptomyces corchorusii*. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, **47**:453-454, 1983.
- NAGAHIRO, M. The distribution of α -amylase inhibitors in various beans. **Eiyo to Shokuryo**, Tokyo, **34**:341-347, 1981.
- 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**:387-396, 1981.
- 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.
- OSBORN, T.; ALEXANDER, D.C.; SUN, S.S.M.; CARDONA, C.; BLISS, F.A. Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. **Science**, Washington, **240**:207-210, 1988.
- PETRUCCI, T.; SANNIA, G.; PARLAMENTI, R.; SILANO, V. Structural studies of wheat monomeric and dimeric protein inhibitors of α -amylase. **Biochem. J.**, London, **173**:229-235, 1978.

- PFLUGRATH, J.W.; WIEGAND, G.; HUBER, R.; VERTESY, L. Crystal structure determination, refinement and molecular model of the α -amylase inhibitor HOE-467A. **J. Mol. Biol.**, London, **189**:383-386, 1986.
- 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**:1371-1377, 1978.
- 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**:239-260, 1977b.
- 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**:217-238, 1977a.
- QIWEN, W.; KLINE, A.D.; WÜTHRICH, K. Amide proton exchange in the α -amylase polypeptide inhibitor Tendamistat studied by two-dimensional ^1H nuclear magnetic resonance. **Biochemistry**, Washington, **26**:6488-6493, 1987.
- 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.
- ROMANELLI, P.F.; LAJOLO, F.M.; FINARDI FILHO, F. Inibidores de α -amilase do triticale (*Triticum x Secale*): purificação parcial. **Rev. Farm. Bioquím. Univ. S.Paulo**, S.Paulo, **24**:50-61, 1988.
- SAITO, N. α -Amylase inhibitor from fungus *Cladosporium herbarum* F-828. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, **257**:3120-3125, 1982.

- SAUNDERS, R.M. & LANG, J.H. Alpha-amylase inhibitors in *Triticum aestivum*: purification and physical-chemical properties. **Phytochemistry**, Oxford, **12**:1237-1241, 1973.
- 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**:443-449, 1977.
- SCHMIDT, D.D.; FROMMER, W.; JUNGE, B.; MÜLLER, L.; WINGENDER, W.; TRUSCHEIT, E.; SCHÄFER, D. α -Glucosidase Inhibitors. New Complex oligosaccharides of microbial origin. **Naturwissenschaften**, Berlin, **64**:535-536, 1977.
- SELTZER, R.D. & STRUMEYER, D.H. Purification and characterization of esculentamin, a proteinaceous α -amylase inhibitor from the faro root, *Colocasia esculenta*. **J. Food Biochem.**, Westport, **14**:199-217, 1990.
- SHAINKIN, R. & BIRK, Y. - α -Amylase inhibitors from wheat isolation and characterization. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, **221**:502-513, 1970.
- 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**:981-991, 1980.
- 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.
- 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.

- SHIVARAJ, B.; SHARMA, K.K.; PATTABIRAMAN, T.N. Natural plant enzyme inhibitor: Part VII - Alpha amylase inhibitors & amylases in plant tubers. **Indian J. Biochem. Biophys.**, New Dehli, **16**:52-55, 1979.

- SILANO, V.; FURIA, M.; GIANFREDA, L.; MACRI, A.; PALESCANDOLO, 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**:170-178, 1975.

- SILANO, V.; POCCHIARI, F.; KASARDA, D.D. Physical characterization of α -amylase inhibitors from wheat. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, **317**:139-148, 1973.

- 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**:510-512, 1982.

- SMARTT, J. & HYMOWITZ, T. Domestication and evolution of grain legumes. In Summerfield, R.J. e Roberts, E.H. eds., **Grain Legumes Crops**, London, Collins, 1985, p. 37-72.

- SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in chromatography of aminoacids. **Anal. Chem.**, Washington, **30**:1190-1206, 1958.

- STANKOVIC, S.C. & MARKOVIC, N.D. A study of amylase inhibitors in the acorn. **Glasnik Hem.Drustva**, Belgrado, **25/26**:519-525, 1960/1, **apud Chem.Abst.**, **59**:3084d, 1983.

- STRUMEYER, D.H. A modified starch for use in amylase assay. **Anal. Biochem.**, Baltimore, **150**:76-85, 1967.

- SUMMERFIELD, R.J. & ROBERTS, E.H. Recent trends in internationally orientated research on grain legumes. In Summerfield, R.J. & Roberts, E.H. eds., **Grain Legumes Crops**, London, Collins, p. 801-846, 1985.

- TANIZAKI, M.M. & LAJOLO, F.M. Kinetics of the interaction of pancreatic α -amylase with a kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) -amylase inhibitor. **J. Food Biochem.**, Westport, **9**:71-89, 1985.

- TANIZAKI, M.M.; LAJOLO, F.M.; FINARDI FILHO, F. Combination of black bean (*Phaseolus vulgaris*) amylase inhibitor with modified pancreatic α -amylase. **J. Food Biochem.**, Westport, **9**:91-104, 1985.

- TROYANO PUEYO, M.; FINARDI FILHO, F.; MERCER PERNASETTI, F.; LAJOLO, F.M. A possible physiological role for a cereal alpha amylase inhibitor. **Int. Symp. on Crytallography and Molecular Biology**, Guarujá, 5-9 Nov., 1990.

- VAN DEN OETELAAR, P.J.M. & HOENDERS, H.J. Folding-unfolding and aggregation - dissociation of bovine α -crystalline subunits; evidence for unfolding intermediates of the α A subunits. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, **995**:91-96, 1989.

- VÉRTESY, L. & TRIPIER, D. Isolation and structure elucidation of an α -amilase inhibitor, AI-3688, from *Streptomyces aureofaciens*. **FEBS Lett.**, Amsterdam, **185**:187-190, 1985

- VÉRTESY, L.; OEDING, V.; BENDER, R.; ZEPF, K.; NESEMANN, G. Tendamistat (HOE467), a tight-binding α -amylase inhibitor from *Streptomyces fendae* 4158. Isolation, biochemical properties. **Eur. J. Biochem.**, Amsterdam, **141**:505-512, 1984.

- VITTOZZI, L. & SILANO, V. The phylogenesis of proteins α -amylase inhibitors from wheat seed and the speciation of polyploid wheats. **Theor. Appl. Gent.**, New York, **48**:279-84, 1976.

- WHITAKER, J.R. α -Amylase inhibitor of higher plants and microorganisms. In: Kinsella, J.E. e Soucie, W.G. eds., **Food Proteins**, AOAC, Champaign, 1989, p. 354-380.

- WHITAKER, J.R.; FINARDI FILHO, F.; LAJOLO, F.M. Parameters involved in binding of porcine pancreatic α -amylase with black bean inhibitor: role of sulfhydryl groups, chloride, calcium, solvent composition and temperature. **Biochimie**, Paris, **70**:1153-1161, 1988.

- WILCOX, E.R. & WHITAKER, J.R. Some aspects of the mechanism of complexation of red kidney bean α -amylase inhibitor and α -amylase. **Biochemistry**, Washington, **23**:1783-1791, 1984.

- WOLEVER, T.M.S.; CHAN, C.; LAW, C.; BIRD, L.; RAMDATH, D.; MORAN, J.J.; JENKINS, D.J.A. The *in vitro* and *in vivo* anti-amylase activity of starch blockers. **J.Plant Food**, London, **5**:23-30, 1983.

- WRIGLEY, C.M. Gel electrofocusing. **Meth. Enzymol.**, New York, **22**:559-564, 1971.

- 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**:243-244, 1979.

- YIN, X.; HO, F.M.; FINARDI FILHO, F.; LAJOLO, F.M.; WHITAKER, J.R. Structural and mechanistic aspects of common bean (**Phaseolus vulgaris**) α -amylase inhibitors. **Cong.Bras.Proteínas**, Campinas, 1990.

- YOKOSE, K.; OGAWA, M.; OGAWA, K. New α -amylase inhibitor, Trestatins. III Structure determination of new Trestatin components Ro 09-0766, Ro 09-0767 and Ro 09-0768. **J. Antibiot.**, Tokyo, **37**:182-186, 1984.

- ZAWISTOWSKA, U.; FRIESEN, A.D.; LANGSTAFF, J. Purification and characterization of two double-headed tritcale isoinhibitors of endogenous alpha-amylase and subtilisin. **J.Food Biochem.**, Westport, **13**:215-239, 1989.
- ZAWISTOWSKA, U.; LANGSTAFF, J.; BUSHUK, W. Improving effect of a natural α -amylase inhibitor on the baking quality of wheat flour containing malted barley flour. **J. Cereal Sci.**, London, **8**:207-209, 1988.
- ZAWISTOWSKA, U.; LANGSTAFF, J.; McVICAR, L.; FRIESEN, A.D. Canadian Patent Pending, 1987.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

8. RESUMO

Foram purificados dois isoinibidores de α -amilase (IAs) do feijão preto, *Phaseolus vulgaris*, cv. Rico 23, através de extração aquosa, precipitação fracionada com sulfato de amônio, diálise contra água destilada e cromatografias em colunas de troca iônica, interação hidrofóbica e peneira molecular. Foram analisadas as características químicas dos inibidores (I-1 e I-2), apresentando: 9,9 e 12,1% de carboidratos, 58 e 51 KDaltons de peso molecular, 4,70 e 4,65 como pontos isoeletrônicos e 13,4 e 36,7 de hidrofobicidade superficial, respectivamente. Também foram analisados o conteúdo de amino ácidos, os mapas trípticos, bem como as condições de dissociação molecular e mudanças conformacionais por agentes químicos e temperatura, avaliadas em SDS-PAGE, calorimetria diferencial e emissão de fluorescência. A separação das subunidades peptídicas foi realizada por cromatografia em DEAE-celulose-uréia 6M, procedendo-se o seqüenciamento parcial de 3 peptídeos isolados. A confrontação das seqüências obtidas com a seqüência da var. Greensleaves revelou homologias de até 59%. Porém, diferenças marcantes entre o I-1 e o I-2 demonstram que essas proteínas devem ser sintetizadas a partir de DNAs distintos. As proteínas isoladas são comprovadamente isoinibidores pertencentes a uma nova família de inibidores de α -amilase específica dos *Phaseolus vulgaris*.

9. ABSTRACT

Two α -amylase isoinhibitors, I-1 and I-2, were purified from black beans *Phaseolus vulgaris*, cv. Rico 23. Both are glycoproteins acting on mammalian and insect α -amylases, having similar isoelectric points, 4.70 and 4.65, and aminoacid composition, but showing different molecular weights, 58 and 51 KDaltons, and surface hydrophobicity, 13.4 and 36.7, respectively. Conformational changes due to dissociating agents and temperature were detected by SDS-PAGE, DSC and by following the fluorescence emission. The peptides dissociated by urea-SDS- β -mercaptoethanol were isolated on a urea-DEAE-celulose column. Three of the isolated peptides were sequenced showing up to 59% homology with the deduced sequence from the inhibitor of the var. Greensleaves. In spite of the similarity, they seem to be synthesized by different DNAs.

10. LISTA DE TABELAS

Nº	Nome	Pag.
1	Controle da preparação dos inibidores de α -amilase	28
2	Conteúdo de carboidratos dos IAs de feijão	38
3	Valores de pesos moleculares, velocidade de eluição e constante cromatográfica	39
4	Comparação dos pesos moleculares dos IAs de feijão	42
5	Composição de amino ácidos	46
6	Seqüência de amino ácidos dos peptídeos do I-1 e do I-2.....	68
7	Homologia das seqüências dos IAs do feijão Rico 23 com a decodificada do cDNA da var. Greensleaves	71

11. LISTA DE FIGURAS

Nº	Nome	Pág.
1	Esquema de purificação dos inibidores de α -amilase	21
2	Cromatografia em coluna de DEAE-celulose	30
3	Cromatografia em coluna de Octyl-Sepharose	31
4	Cromatografia em coluna de Phenyl-Sepharose	32
5	Cromatografia do I-1 em coluna de Sephadex G-100	34
6	Cromatografia do I-2 em coluna de Sephadex G-100	35
7	Eletroforese dos inibidores purificados	36
8	Determinação do peso molecular	41
9	Focalização isoeletrica dos inibidores	43
10	Determinação dos pontos isoeletricos dos inibidores	44
11	Mapa tríptico comparativo dos inibidores de α -amilase	49
12	Mapa tríptico dos inibidores em coluna de TMS 250	50
13	Influência da temperatura sobre a dissociação dos inibidores	52
14	Influência do tempo de aquecimento sobre a dissociação dos inibidores	53
15	Denaturação térmica em DSC em função do pH	55

16	Denaturação térmica em DSC em função da concentração de uréia	56
17	Pesos moleculares das sub-unidades	59
18	Espectro de emissão de fluorescência dos inibidores	60
19	Mudanças conformacionais em função da concentração de uréia	61
20	Reversibilidade conformacional	62
21	Cromatografia em DEAE-celulose/uréia do I-1	64
22	Cromatografia em DEAE-celulose/uréia do I-2	65
23	Eletroforese dos peptídeos isolados do I-1	66
24	Eletroforese dos peptídeos isolados do I-2	66
25	Alinhamento das seqüências dos inibidores com a da var. Greensleaves	70

12. LISTA DE ABREVIATURAS

α AI	DNA que codifica o inibidor de α -amilase da var. Greensleaves
BASI	"barley α -amylase/subtilisin inhibitor" - inibidor de α -amilase/subtilisina obtido de cevada
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
cv.	cultivar
CPA	ácido cis-parinário
DEAE	dietil-aminoetil
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNS	ácido 2,4 dinitrossalicílico
FPLC	"fast protein liquid chromatography" - cromatografia líquida de proteína de alto desempenho
HAIM	"Hog α -Amylase Inhibitor" - inibidor de α -amilase de suínos
HPLC	"High Pressure Liquid Chromatography" - cromatografia líquida de alto desempenho
IA(s)	inibidor(es) de α -amilase(s)
I-1	inibidor 1 de α -amilase obtido de feijão
I-2	inibidor 2 de α -amilase obtido de feijão
K_c	constante cromatográfica

LLP	"lectin like protein" - proteína semelhante à lectina
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PAIM	"Pancreatic α -Amylase Inhibitor" - inibidor de α -amilase pancreática
PLTP	proteína transportadora de fosfolipídeos
ppt	precipitado
SDS	dodecil-sulfato de sódio
TCA	ácido tricloroacético
TFA	ácido trifluoroacético
TFP	tampão fosfato padrão - fosfato 0,02M, pH 7,6
TRIS	tris(hidroxi)aminometano
WASI	"Wheat α -Amylase/Subtilisin Inhibitor" - inibidor de α -amilase/subtilisina obtido de trigo
UI	unidade de inibição de α -amilase
UV	ultra-violeta
var.	variedade
V_{el}	volume de eluição
V_o	volume de exclusão
V_t	volume total do gel

13. LISTA DE ABREVIATURAS DOS AMINO ÁCIDOS

ala	alanina
arg	arginina
asn	asparagina
asp	ácido aspártico
cys	cistina/cisteína
gln	glutamina
glu	ácido glutâmico
gly	glicina
his	histidina
ile	isoleucina
leu	leucina
lys	lisina
met	metionina
phe	fenilalanina
pro	prolina
ser	serina
thr	treonina
tyr	tirosina
val	valina