



**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E NUTRICIONAIS DE PROTEÍNAS DE
FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris*, L.) VARIEDADE ROSINHA G2.**

V. C. SGARBIERI, PhD

TESE APRESENTADA PARA O CONCURSO DE LIVRE DOCÊNCIA

CAMPINAS - 1979

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

DEDICAÇÃO

Ao Professor Doutor André Tosello, pioneiro e incansá
vel propulsor da ciência e da tecnologia de alimentos no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor André Tosello pelo incentivo e apoio.

Ao Professor Pedro Luiz Antunes pelas discussões técnicas e assistência prestada no decorrer de vários ensaios durante esta pesquisa.

À Professora Maria Antonia M. Galeazzi pela assistência durante o estudo de caracterização eletroforética e nas determinações de peso molecular.

Ao Professor Felix Guillermo R. Reyes pela assistência prestada na caracterização cromatográfica dos monossacarídeos da fração albumina e dos inibidores.

A Roberto G. Junqueira pelo fornecimento da hemaglutinina isolada e purificada em nosso laboratório e utilizada em um dos ensaios biológicos.

Aos técnicos do laboratório que muito contribuíram para a execução deste trabalho, em especial à Adelaide M. Soares da Costa cuja assistência técnica foi de vital importância em, praticamente, todas as etapas desta pesquisa.

À minha esposa Astrid e ao meu filho Ricardo pela confiança e pelo apoio moral sempre presentes.

ÍNDICE GERAL

SUMMARY	1
RESUMO	6
INTRODUÇÃO	11
REVISÃO DA LITERATURA	
Composição e valor biológico	14
Proteínas tóxicas e antinutricionais	22
Propriedades físico-químicas	31
MATERIAL E MÉTODOS	
Variedade	45
Extração das proteínas	45
Obtenção de frações protéicas a partir do extrato bruto	46
Purificação dos inibidores da tripsina e da quimo tripsina	48
Extração e purificação parcial da tripsina humana	49
Métodos Analíticos	
Proteína	49
Nitrogênio não protéico	50
Composição centesimal aproximada	50
Açúcares totais	50
Aminoácidos	50
Atividade da tripsina, da quimotripsina e dos inibidores	50
Atividade da desidrogenase láctica	51

Identificação dos açúcares	51
Proteólise enzimática	53
Sulfitólise	53
Oxidação com ácido perfórmico	53
Dosagem de grupos sulfidrilos	53
Eletroforese	53
Isoeletrofocalização	56
Coeficiente de sedimentação	57
Métodos de avaliação nutricional	
Quociente de eficiência protéica	58
Balanço de nitrogênio	58
Índice de utilização protéica	59
Metionina disponível	59

RESULTADOS

Extratibilidade das proteínas em função do pH	61
Extratibilidade das proteínas por diversos tipos de solventes	61
Influência do tratamento térmico do grão sobre a extratibilidade das proteínas em água destilada	68
Fracionamento e análise das proteínas	72
Caracterização e eletroforética das proteínas nas principais frações protéicas	82
Poder de hidrólise da pepsina e da pancreatina sobre as proteínas de diferentes frações protéicas	84

Isolamento e purificação dos inibidores de tripsina e de quimotripsina	90
Caracterização eletroforética das proteínas da fração albumina nos diversos estágios de purificação dos inibidores	102
Composição dos inibidores de tripsina e de quimotripsina	106
Propriedades físico-químicas e bioquímicas dos inibidores de tripsina e de quimotripsina	111
Propriedades nutricionais das proteínas do feijão Rosinha G2	145
 DISCUSSÃO	
Solubilidade e extratibilidade das proteínas do feijão Rosinha G2	155
Propriedades físico-químicas dos inibidores de tripsina e de quimotripsina	161
Composição e propriedades nutricionais das proteínas do feijão Rosinha G2	172
CONCLUSÕES	186
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	191

ÍNDICES DE QUADROS E FIGURAS

QUADROS

I. Propriedades de alguns inibidores de tripsina e/ou quimotripsina	44
II. Extratibilidade das proteínas de feijão em água destilada	65
III. Extração dupla das proteínas de feijão com água e com NaCl 0,5M	66
IV. Extração fracionada das proteínas de feijão com vários solventes	67
V. Efeito do tratamento térmico sobre a extratibilidade das proteínas e sobre os inibidores de tripsina e de quimotripsina	70
VI. Porcentagens de proteína e de carboidrato total nas diversas frações protéicas isoladas	77
VII. Composição em aminoácidos das diversas frações protéicas isoladas	79
VIII. Composição em aminoácidos da farinha integral, do resíduo insolúvel e dos sólidos dialisáveis do feijão Rosinha G2	80
IX. Poder de hidrólise da pepsina e da pancreatina sobre as proteínas do feijão Rosinha G2	88
X. Efeito de vários tratamentos das albuminas e das globulinas sobre o poder de hidrólise dessas proteínas pela pepsina e pela pancreatina	89

XI. Atividade específica e grau de purificação dos inibidores de tripsina e de quimotripsina em várias frações protéicas	93
XII. Atividade específica, grau de purificação e porcentagens de recuperação dos inibidores em várias fases da purificação	100
XIII. Atividade específica dos inibidores de tripsina e de quimotripsina em diferentes frações protéicas	101
XIV. Composição em aminoácidos dos inibidores de tripsina e de quimotripsina	108
XV. Influência do pH na inativação térmica (97°C, 30 min) dos inibidores	116
XVI. Influência do pH na inativação térmica (97°C, 30 min) dos inibidores de tripsina e de quimotripsina	117
XVII. Influência do tempo e de incubação na inativação térmica (130°C, pH 3,8) dos inibidores de tripsina	118
XVIII. Influência do tempo de incubação na inativação térmica (130°C, pH 7) dos inibidores de tripsina	119
XIX. Influência da concentração de uréia (50°C) na inativação dos inibidores	120
XX. Efeito da concentração de mercaptoetanol na inativação dos inibidores	121

XXI. Efeito da concentração de ditiotreitol (25°C) na inativação dos inibidores	122
XXII. Efeito da concentração de ditiotreitol (97°C) na inativação dos inibidores	123
XXIII. Reação da N-etilmaleimida com grupos sulfidri <u>l</u> os livres dos inibidores e da glutat <u>ion</u> a	124
XXIV. Parâmetros utilizados para determinação do peso molecular dos inibidores	127
XXV. Atividade residual da tripsina ou da quimo- tripsina após pré-incubação de uma das enzi <u>m</u> as com os inibidores (IG-50)	140
XXVI. Atividade inibidora sobre as tripsinas humana e bovina	141
XXVII. Parâmetros moleculares e constantes físico- químicas para os inibidores	144
XXVIII. Composição centesimal da farinha integral e de algumas frações protéicas	150
XXIX. Valores de PER para as proteínas da farinha integral e de algumas frações protéicas	151
XXX. Balanço de nitrogênio, valor biológico e di <u>g</u> estibilidade aparentes das proteínas do fei <u>j</u> jão Rosinha G2	152
XXXI. Disponibilidade de metionina em proteínas do feijão Rosinha G2	153
XXXII. Influência da presença de inibidor e de uma hemaglutinina sobre as propriedades nutricio <u>n</u> ais da caseína	154

FIGURAS

1. Regulação da secreção da tripsina pelo pâncreas	25
2. Extração e fracionamento das proteínas do feijão Rosinha G2	47
3. Extratibilidade das proteínas em função do pH do solvente	64
4. Efeito do tratamento térmico sobre a extratibilidade das proteínas e dos inibidores	71
5. Perfil cromatográfico dos trimetilsilil derivados dos açúcares neutros isolados das albuminas (F ₁)	81
6. Perfil eletroforéticos das principais frações protéicas isoladas do feijão Rosinha G2	83
7. Ultrafiltração em gel de Sephadex G-100 de um extrato bruto de feijão Rosinha G2	92
8. Ultrafiltração em gel de Sephadex G-100 da fração albumina não coagulável (97°C, 15 min)	96
9. Ultrafiltração em gel de Sephadex G-50 do precipitado (0,65 saturação) de sulfato de amônio	97
10. Recromatografia dos inibidores em coluna de Sephadex G-50	98
11. Cromatografia dos inibidores em coluna de DEAE-celulose	99
12. Perfis eletroforéticos de algumas frações protéicas (albuminas) contendo os inibidores	104

13. Perfis eletroforéticos das proteínas da fração albumina não coagulável	105
14. Perfis eletroforéticos dos inibidores com diferentes graus de purificação	105
15. Cromatografia em papel dos açúcares neutros obtidos do inibidor IG-50	109
16. Cromatografia dos trimetilsilil derivados dos açúcares neutros contidos nos inibidores	110
17. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade dos inibidores em varias frações protéicas	112
18. Picos de sedimentação da desidrogenase láctica e dos inibidores em gradiente de sacarose	126
19. Curva padrão para a determinação de peso molecular por ultrafiltração em gel de Sephadex G-100	128
20. Curva semi-logarítmica do PM v.s MR de proteínas padrões em gel de poliacrilamida contendo SDS	129
21. Curva padrão do raio de Stokes v.s. função erro complementar inversa para K_D	133
22. Isoeletrofocalização dos inibidores em gel de poliacrilamida	137
23. Inibição da tripsina e da quimotripsina em função da concentração de inibidor	138
24. Gráfico de Lineweaver-Burk para a ação da tripsina sobre BAPNA na ausência e na presença de inibidor	143

SUMMARY

The main objectives of the work presented here were to isolate and study the composition and some physicochemical and nutritional properties of bean (*Phaseolus vulgaris*, L) protein from the variety "Rosinha G2". In the same study, the isolation, purification and partial characterization of the bean trypsin and chymotrypsin inhibitors were attempted. The extractability of the proteins was studied as a function of pH and ionic strength of the extracting media. Under acidic (pH < 3) or alkaline (pH > 8) conditions, 85 to 95% of the total integral flour nitrogen was extracted. Minimum extractability occurred in the range of pH between 3.5 and 5.0. Two sequential extractions of the flour, first with distilled water, then with 0.5M NaCl solution, extracted around 80% of the total nitrogen. Sequential extractions of the same flour with various solvents revealed that 48% of the total nitrogen was extracted with distilled water, 25.6% with 0.5M NaCl solution, 19.3% with a sodium borate buffer (pH 10) containing 0.5% 2-mercaptoethanol and 0.5% lauryl sodium sulfate. Total extraction accounted for 92.8% of total nitrogen of the bean flour.

Heating the soaked beans in boiling water (97°C) for various times indicated that 5 min of heating decreased the extractability of the proteins 50%, while 4 min of heating completely inactivated the trypsin and chymotrypsin inhibitors.

Dialysis of a salt extract against distilled water caused the separation of the proteins into two fractions: soluble in water (30%) and insoluble (70%). About 70-75% of the total nitrogen of the crude extract was recovered after dialysis for 72 hours.

Most of the trypsin and chymotrypsin inhibiting activities were associated with the water soluble (albumin)proteins. Heating the albumin solutions for 15 min at 97°C coagulated 65-70% of the proteins whereas the trypsin and chymotrypsin inhibitors remained in solution with full activity. The isolation and purification of the inhibitors from the non-coagulated fraction (97°C, 15 min) were accomplished by ammonium sulfate precipitation (0.65 saturation), Sephadex G-50 ultrafiltration, chromatography on DEAE-cellulose and polyacrylamide gel electrophoresis. Final purification was 31 fold by comparison with the crude extract.

All the isolated protein fractions contained carbohydrate in different proportions. A hydrolysate of the albumin fraction contained glucose, mannose, arabinose, galactose and xylose. The purified inhibitors contained 3.75% total carbohydrate, represented by mannose, xylose and glucosamine. As to the amino acid composition, a common feature of the bean protein fractions was the very low methionine content. The albumin fraction showed a higher methionine content than the water insoluble protein fractions. The trypsin and chymotrypsin inhibitors isolate from the albumin fraction revealed high concentra

tions of cystine, serine, threonine and proline, in addition to aspartic and glutamic acids. On the other hand the concentrations of methionine, valine, leucine, tyrosine and phenylalanine were very low. Tryptophan and cysteine were totally absent from the inhibitors molecules.

The combined ultracentrifugation and gel-filtration data permitted the calculation of the following parameters for the isolated inhibitors: molecular weight, 20,000; partial specific volume, 0.69; Stokes molecular radius, 20 Å, diffusion coefficient, 10.7×10^{-7} , and a frictional ratio of 1.14.

Isoelectric focusing in polyacrylamide gel indicated the presence in the purified preparation of two protein components with trypsin and chymotrypsin inhibiting power having isoelectric points at pH's 5.1 and 6.0.

Incubation of the inhibitors, first with trypsin and then with chymotrypsin or vice versa, suggested the existence in the inhibitor molecules of separate and independent binding sites for trypsin and for chymotrypsin. The inhibition of trypsin and of chymotrypsin in the presence of casein as substrate was of the non-competitive type. The inhibition of trypsin in the presence of benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide (BAPNA) was of a mixed type. Human trypsin was inhibited by the isolated bean inhibitors 3.6 times more effectively than bovine trypsin.

The inhibitors were very resistant to heat in water or in mildly acidic solutions; they were, however, quickly inactivated.

a 10% casein diet, decreased the casein digestibility by 7%, the apparent biological value by 12%, and reduced the rat growth by 33%, as compared with the casein control diet.

O presente trabalho teve como principais objetivos o isolamento, o estudo da composição e do valor nutricional das principais frações protéicas do feijão (*Phaseolus vulgaris*, L) var. Rosinha G2, além da purificação e do estudo das propriedades dos inibidores da tripsina e da quimotripsina, presentes na fração albumina (F_1).

A extratibilidade das proteínas foi estudada em função do pH e da concentração salina ou força iônica do meio solvente. Em soluções ácidas ($\text{pH} < 3$) ou alcalinas ($\text{pH} > 8$) conseguiu-se extrair entre 85 e 95% do nitrogênio total da farinha integral. A faixa de pH de menor extratibilidade foi entre 3,5 e 5,0. Duas extrações sucessivas da mesma amostra, a primeira com água destilada e a segunda com solução 0,5M de NaCl, extraia pelo menos 80% do nitrogênio da farinha integral. Extração fracionada da mesma farinha com vários solventes revelou que 48% do nitrogênio total era extraído com água destilada, 25,6% com solução 0,5M de NaCl, 19,3% com tampão borato de sódio pH 10,0, contendo 0,5% de mercaptoetanol e 0,5% de lauril sulfato de sódio, perfazendo a extração de 92,8% do nitrogênio total.

Tratamento dos grãos a 97°C por vários intervalos de tempo mostrou que a solubilidade das proteínas em água diminuía de, praticamente 50%, após 5 min de aquecimento, tornando-se essencialmente insolúvel depois de 60 min de aquecimento. O aque

cimento dos grãos por 4 min a 97°C inativou, completamente, os inibidores de tripsina e de quimotripsina.

A diálise de um extrato salino permitiu a separação das proteínas em duas frações: solúveis em água (30%) e insolúveis (70%). Cerca de 70 - 75% do nitrogênio do extrato bruto era recuperado após 72h de diálise.

A maior atividade inibidora de tripsina e de quimotripsina era encontrada nas proteínas solúveis em água (albuminas). Aquecimento das albuminas (15 min, 97°C) coagulava 65 - 70% das proteínas. Os inibidores de tripsina e de quimotripsina permaneciam em solução na fração não coagulável, sem sofrer nenhuma inativação.

O isolamento e a purificação desses inibidores foram conseguidos, a partir da fração albumina não coagulável, pela precipitação com sulfato de amônio 0,65 de saturação, ultrafiltração em gel de Sephadex G-50, cromatografia em colunas de DEAE-celulose e eletroforese em gel de poliacrilamida. O grau de purificação alcançado foi de 31 vezes em relação ao extrato bruto.

Todas as frações protéicas isoladas continham carboidrato em várias proporções. Os monossacarídeos identificados no hidrolisado ácido da fração albumina foram glicose, manose, arabinose, galactose e xilose. A preparação purificada (IG-50) continha 3,75% de carboidrato total, que no hidrolisado aparecia como manose e xilose, além da glicosamina que ficava retida na coluna de troca catiônica.

Quanto aos aminoácidos, a característica comum a todas as proteínas dessa variedade de feijão foi o teor bastante baixo de metionina, sendo que a fração albumina apresentou um teor mais elevado que as proteínas insolúveis em água.

Os inibidores isolados da fração albumina apresentaram concentrações elevadas dos aminoácidos cistina, serina, treonina e prolina, além dos aminoácidos aspártico e glutâmico. Apresentaram, porém, concentrações muito baixas de metionina, valina, leucina, tirosina e fenilalanina. O triptofânio e a cisteina estavam totalmente ausentes das moléculas dos inibidores.

Foram determinados para os inibidores isolados em coluna de Sephadex G-50 os seguintes parâmetros moleculares: peso molecular 20.000, volume específico parcial 0,69, raio molecular 20A, coeficiente de difusão $10,7 \times 10^{-7}$ e um quociente fric^ocional de 1,14. A isoeletrofocalização indicou a presença de dois componentes protéicos ativos na preparação obtida em colunas de Sephadex ou de DEAE-celulose, um a pH 5,1 e outro a pH 6,0, indicando que essa preparação não era totalmente homogênea, o que foi também verificado na eletroforese em gel de poliacrilamida.

Testes de incubação, primeiro com tripsina e depois com quimotripsina, ou vice-versa, sugeriram que os inibidores possuem em suas moléculas centros de ligação separados e independentes para inibição da tripsina e da quimotripsina. A inibição em presença da caseína como substrato foi do tipo não competitivo para as duas enzimas. A inibição da tripsina em presença

de benzoil-DL-arginina p-nitroanilida (BAPNA) foi do tipo misto. A preparação (IG-50) foi 3,6 vezes mais ativa sobre tripsina humana que sobre a tripsina bovina.

Quando em solução aquosa, os inibidores exibiam uma resistência térmica muito grande, sendo porém, inativados pelo aquecimento em pH alcalino ou em presença de agentes redutores das ligações dissulfídicas. A oxidação com ácido perfórmico produziu, também, a completa destruição do poder inibidor.

O valor nutricional de todas as frações protéicas isoladas dessa variedade de feijão foi bastante baixo, verificando-se uma melhoria surpreendente dos índices nutricionais, com a adição às dietas, dos aminoácidos sulfurados metionina e cisteína, em concentrações suficientes para atender às necessidades do rato em crescimento. Os valores de PER que foram inferiores a 1,0, em todas as frações protéicas isoladas, elevaram-se para valores igual ou superior a 4,0, com a adição às dietas de 0,3% de DL-metionina e 0,2% de L-cisteína. A adição de igual porcentagem de cisteína e metionina à dieta, contendo farinha integral com fonte de proteína, elevou o PER de 1,17 a 2,47 apenas.

A principal causa do reduzido valor nutricional das proteínas do feijão Rosinha G2, além da deficiência em aminoácidos sulfurados, parece ser a baixa disponibilidade biológica da metionina que foi de 46% na farinha integral, 51% na fração globulina, 34% no isolado protéico total, 5,8% na fração albumina e 4,6% na proteína do resíduo insolúvel após extração da proteína.

A adição dos inibidores isolados em dietas com 5 e 10% de caseína nas proporções de 0,6 e 1% da dieta, não alterou os índices de utilização da caseína, bem como, não produziu nenhum atraso no crescimento dos ratos.

A adição a uma dieta com 10% de caseína de uma hemaglutinina isolada da fração albumina, produziu uma diminuição de 7% na digestibilidade e 12% no valor biológico da caseína, além de ter reduzido o crescimento a 2/3 em relação ao dos animais tomados como controle.

INTRODUÇÃO

As sementes de plantas da família *Leguminosae* têm atraído muito interesse nas últimas décadas como fonte de proteína para a alimentação animal e humana, por apresentarem elevado conteúdo de proteínas no grão, em algumas espécies, de elevado valor biológico.

Alguns pesquisadores (Aykroid e Doughty, 1964) reportaram sobre a existência de aproximadamente 600 gêneros de plantas leguminosas com cerca de 13.000 espécies, das quais apenas 10 ou 12 são de interesse econômico, atualmente. As espécies do gênero *Phaseolus*, que incluem as sementes comumente conhecidas como feijões, são as de maior interesse para a alimentação humana em vários países da América Latina e de outras partes do mundo.

No Brasil, a espécie *Phaseolus vulgaris*, L, incluindo diversos cultivares comerciais e um grande número de linhagens experimentais, constitui uma fonte importante e indispensável de proteína para alimentação humana, não só pelo seu elevado teor protéico mas, acima de tudo, pelo hábito arraigado de consumo dessa leguminosa na dieta diária, praticamente, de todas as classes sociais.

Apesar do consumo sistemático dos feijões em nosso meio e, portanto, da sua importância social e econômica para o país, poucas pesquisas, principalmente nas áreas da bioquímica

e da nutrição, têm sido realizadas com as principais variedades de feijões, cultivadas e consumidas no Brasil.

Nosso interesse pelas pesquisas bioquímicas e nutricionais com feijões brasileiros, tiveram início há cerca de três anos, abrangendo aspectos bastante diversos como: a) produção de proteína, composição de aminoácidos e, particularmente, teor de metionina e de cistina em linhagens experimentais de *Phaseolus vulgaris* mantidas na coleção da Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas; b) estudo da composição em aminoácidos e do valor biológico das proteínas dos cultivares comerciais brasileiros; c) efeito das condições ecológicas (tipo de solo, clima e adubação nitrogenada) na produção e na qualidade das proteínas das principais variedades comerciais; d) efeito do tempo e das condições de estocagem sobre as propriedades nutricionais das proteínas de feijão; e) disponibilidade biológica da metionina e de outros aminoácidos essenciais em proteínas de feijão; f) digestibilidade e fatores que influem na digestibilidade das proteínas; g) estudo de isolamento e de caracterização de proteínas tóxicas e antinutricionais de ocorrência natural em feijões.

Nesse período, alguns trabalhos já foram concluídos e publicados, estando outros, em vias de publicação. Alguns deles foram citados e discutidos ao longo desta tese.

Os principais objetivos do presente trabalho foram: a) isolar e caracterizar, do ponto de vista da composição e do valor nutricional, as principais frações protéicas da variedade

brasileira Rosinha G2, consumida largamente no Estado de São Paulo; b) isolar e caracterizar os inibidores de tripsina e de quimotripsina contidos na fração albumina dessa variedade de feijão, e; c) avaliar melhor a possível toxicidade ou propriedade antinutricional dos inibidores isolados e purificados, através da incorporação dos mesmos, em dietas nutricionalmente balanceadas para o rato.

COMPOSIÇÃO E VALOR BIOLÓGICO

A porcentagem de proteína nos feijões (*Phaseolus vulgaris*), depois de secos até aproximadamente 10% de umidade no grão, pode variar na faixa de 18 a 38% (Moraes e Angelucci, 1971; Baldi e Salamini, 1973; Silva e Iachan, 1975; Tandon e col., 1957; Jaffé e Brücher, 1974 e Sgarbieri e col., 1978).

A grande variação nos teores de proteína das diferentes linhagens e cultivares de feijões está na dependência de fatores genéticos e fatores ambientais (Evans, 1973; Kelly, 1971 e 1973; Dickson and Hackler, 1973).

Segundo Kelly (1973), a melhoria do valor nutricional do feijão poderá ser efetuada pelo aumento da produção por unidade de área, aumento da concentração da proteína ou melhoria da qualidade da proteína. O ideal seria aumentar esses três parâmetros ao mesmo tempo, o que é muito difícil. Como um mínimo deve-se visar a melhoria de um dos três parâmetros sem, contudo, afetar negativamente os outros dois.

Vários pesquisadores demonstraram uma correlação negativa entre a capacidade de produção de grão e a concentração de proteína nas sementes (Rutger, 1970; Tandon e col. 1957; Leleji e col. 1972). Em geral, as linhagens com maiores teores de proteína no grão contêm uma porcentagem mais alta de nitrogênio não protéico (Johnson e col. 1968). Contudo, segundo Hackler e Dickson (1972), há muitas exceções a essa regra, o que oferece

a oportunidade de seleção de linhagens com alto teor de proteína e baixa concentração de nitrogênio não protéico.

Fatores ambientais como adubação nitrogenada, local e época de plantio, exercem influências significativas sobre a concentração de proteína das sementes de feijão. Lantz e col. (1958) encontraram uma variação bastante grande no teor de proteína para uma mesma variedade plantada em diferentes locais. A influência do local foi muito maior que a de ano e época de plantio.

Apesar do feijão ser considerado, quantitativamente, uma boa fonte de proteína, qualitativamente as suas proteínas deixam muito a desejar. As principais características que afetam o valor biológico das proteínas do feijão são: a) composição em aminoácidos; b) digestibilidade; c) disponibilidade biológica dos aminoácidos; e, d) existência de fatores antinutricionais, de natureza protéica.

A composição em aminoácidos de um grande número de variedades e linhagens de feijões tem sido estudada por um grande número de pesquisadores, dentre os quais (Moraes e Angelucci, 1971; Baldi e Salamini, 1973; Kelly, 1973; Evans e Bandemer, 1967; Kakade e Evans, 1965; Sgarbieri e col. 1979).

As características fundamentais da composição das proteínas de feijão são o elevado teor de lisina e o baixo teor dos aminoácidos sulfurados, metionina e cisteína ou cistina. Os pesquisadores são unânimes em afirmar que os aminoácidos sulfurados, particularmente metionina, são as limitantes nas proteí

nas de feijão. Embora não existam muitas pesquisas a respeito, o segundo aminoácido essencial limitante parece ser o triptofânio (Kelly, 1973).

Baldi e Salamini (1973), estudando a composição em aminoácidos de 22 espécies de *Phaseolus*, encontraram uma variação no teor de metionina de 0,70 a 1,55%, de cistina de 0,55 a 2,28% e de lisina de 5,6 a 8,23%.

Jaffé e Brücher (1974) encontraram em 100 cultivares de feijões de diversas origens 0,98g de cistina e 1,12g de metionina por 16g de nitrogênio, como valores médios.

Tandon e col. (1957) mostraram que a metionina era o aminoácido limitante em 25 variedades de feijões da América Central, enquanto que a concentração de lisina era sempre alta. Encontraram para metionina uma variação de 0,80 a 1,39g/16g N (média 1,17) para o triptofânio 0,56 a 0,94 (média 0,68) e para a lisina 7,22 a 9,22 (média 8,46) g/16g N, respectivamente.

Hackler e Dickson (1972) demonstraram a existência de correlações surpreendentemente altas na herança genética para diferentes aminoácidos, o que indica a possibilidade de seleção para mais de um aminoácido ao mesmo tempo. Foi muito significativa a correlação positiva de 0,78 entre metionina e lisina, pois, em qualquer programa de melhoramento visando aumentar a concentração de metionina, em leguminosas, é interessante manter sempre alta a concentração de lisina.

A baixa digestibilidade é outro fator que concorre para o baixo valor biológico das proteínas de sementes de legumi

nosas em geral, e particularmente, das proteínas de sementes de feijões do gênero *Phaseolus* (Bressani e col. 1973; Jaffé, 1950a e 1950b; Jaffé, 1973).

Apesar da importância nutricional atribuída à baixa digestibilidade das proteínas das sementes de feijões, poucos estudos existem a esse respeito. Jaffé (1950b) estudou comparativamente a digestibilidade verdadeira das proteínas de várias espécies de leguminosas, entre outras, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna sinensis*, *Pisum sativum*, *Cajanus cajan*, *Lens esculenta* e *Cicer arietinum*, verificando uma variação de 59,5 a 93,9 na porcentagem de digestibilidade. A porcentagem mais baixa encontrada foi de 59,5% para *Cajanus cajan*, enquanto que a mais alta foi de 93,9% para uma variedade de *Pisum sativum*. Para três variedades de *Phaseolus vulgaris* (branca, rosa e preta) as porcentagens de digestibilidade foram 84,1; 79,5; e 76,8%, respectivamente, indicando variação na digestibilidade não somente entre espécies diferentes mas também entre variedades de uma mesma espécie. Cumpre salientar que todos esses valores de digestibilidade foram determinados nas sementes cozidas, após a inativação dos inibidores de enzimas digestivas existentes em sementes de leguminosas. Pode-se observar que, para as variedades de *Phaseolus vulgaris* a pigmentação do tegumento parece estar correlacionada com a digestibilidade das proteínas. Quanto mais pigmentada a semente, mais baixa parece ser a digestibilidade.

O efeito do tratamento térmico dos grãos sobre a digestibilidade *in vitro* e a não existência de correlação entre as

atividades dos inibidores de tripsina e de quimotripsina e o grau de digestibilidade das proteínas, foram demonstradas por Jaffé (1973), Sgarbieri e col. (1979) e Sgarbieri (1979).

Jaffé (1973) demonstrou que uma variedade de feijão sem nenhuma atividade de tripsina e de quimotripsina apresentou 49% de digestibilidade quando crua e 71% depois de cozida, enquanto que outra variedade, com 65 unidades de atividade de tripsina e 17 unidades de quimotripsina, por grama, apresentou digestibilidade de 55% quando crua e 80% depois de cozida.

Sgarbieri (1979) verificou a mesma ausência de correlação entre atividade antiproteolítica e digestibilidade das proteínas, em sementes de sete espécies, compreendendo 26 variedades de leguminosas. A digestibilidade das proteínas nas sementes cruas variou de 25 a 64,3%, não guardando nenhuma correlação, positiva ou negativa, com a atividade do inibidor de tripsina nos extratos dessas sementes ou com a digestibilidade após o cozimento dos grãos.

A digestibilidade *in vitro* das proteínas de quatro variedades brasileiras de *Phaseolus vulgaris* deram resultados entre 39 e 45% quando cruas e entre 60 e 66% depois de cozidas (Sgarbieri e col. 1979). Esses valores são muito baixos comparados com proteínas de alto valor biológico em que a digestibilidade é normalmente superior a 95%.

Até o presente, não se tem uma explicação plausível para a baixa digestibilidade das proteínas de feijão. Não se sabe ainda se existe algum fator que causa uma descarga mais rápida

do conteúdo intestinal com a ingestão de feijão, forçando, por esse mecanismo, que as proteínas passem pelo tubo intestinal parcialmente inabsorvida. Outra possibilidade é que as proteínas de feijão ofereçam resistência natural à proteólise pelas enzimas digestivas, seja pela sua estrutura peculiar ou pela existência de inibidores das enzimas proteolíticas, de baixa atividade específica, mas de grande resistência térmica.

Jaffé e Vega Lette (1968) e Seidl e col. (1969) obtiveram de uma variedade de feijão preto "Kidney Bean" uma fração protéica resistente à digestão *in vitro* por 10 enzimas proteolíticas, mesmo depois de tratada termicamente. Sua ação não foi destruída completamente pela autoclavagem. Pelo fato desta fração protéica, que era uma globulina, representar mais de 30% das proteínas totais do grão, esses autores concluíram que a baixa digestibilidade das proteínas de feijão era devida, em parte, à resistência oferecida à proteólise por essa globulina. Contudo, os mecanismos e os fatores responsáveis pela baixa digestibilidade das proteínas de feijão ainda não são totalmente conhecidos.

A disponibilidade biológica dos aminoácidos dessas proteínas tem sido muito pouco estudada. Evans e col. (1974) estudaram, comparativamente, no feijão "Navy Bean" var. sanilac e na soja, o índice de utilização e a porcentagem de disponibilidade da metionina e da cistina, empregando os métodos de balanço metabólico e dosagem microbiológica com *Leuconostoc mesenteroides* P-60. Encontraram no feijão uma disponibilidade de 51% para metionina e 75% para cistina, comparadas com 74 e 89%, res

pectivamente, na soja. Verificaram também uma menor utilização, no feijão, da metionina adicionada como suplemento. Atribuíram esse fato à possível presença nos grãos de feijão de substância(s) que interferiam com a utilização biológica da metionina. Não puderam, contudo, atribuir esse fato aos inibidores de proteases, uma vez que esses haviam sido convenientemente inativados.

Evans e Bauer (1978) verificaram, através de balanço metabólico e dosagem microbiológica, que 50% da metionina e 41% da cistina da proteína de feijão não estava disponível para o rato. A metionina e a cistina de um extrato de feijão cru revelaram um índice de utilização biológica muito baixo. Quando compararam o valor nutritivo de uma farinha integral de feijão autoclavado, com o das proteínas extraídas do mesmo feijão em solução alcalina (0,2% de KOH) e precipitada em pH 3,8 e com o da fração solúvel em pH 3,8, obtiveram os seguintes valores de PER: 2,35; 2,45 e 0,0; respectivamente. O valor zero encontrado para a fração solúvel em pH 3,8 foi atribuído à presença de algum fator tóxico resistente ao tratamento térmico e, também, à deficiente utilização da metionina e da cistina nessa fração.

O extrato aquoso de feijão autoclavado, quando não dialisado, provocou atraso no crescimento de ratos, porém, o mesmo extrato, depois de dialisado, não causou nenhum problema. Os autores concluíram que o feijão autoclavado ou fervido, deveria conter substâncias solúveis em água e dialisáveis, capazes de retardar o crescimento dos ratos.

Kakade e col. (1969) estudaram a disponibilidade da cistina contida no inibidor de tripsina isolado de "Navy Bean", usando o rato como animal experimental. A dieta base usada nesse estudo foi uma mistura de aminoácidos sintéticos, isenta de cistina, que foi comparada com a mesma dieta, porém adicionada de 0,15% desse aminoácido. Quando, ao invés de cistina foi adicionado o inibidor de tripsina sem nenhum tratamento térmico, os ratos perderam peso, indicando a não disponibilidade biológica da cistina do inibidor. Quando, porém, se usou o inibidor de tripsina autoclavado (2h a 120°C) o ganho de peso e a eficiência da dieta foram comparáveis aos da dieta contendo cistina livre.

A concentração de tripsina ativa no pâncreas e no intestino foi muito mais alta nos ratos que receberam dieta contendo o inibidor autoclavado. A quantidade de cistina e de outros aminoácidos (ácido aspártico, treonina, serina, prolina) foi muito maior nas fezes dos ratos que ingeriram dieta contendo o inibidor não aquecido. Esses autores concluíram que a quantidade elevada de cistina na molécula do inibidor, combinada com a sua capacidade de resistir à proteólise inibindo várias enzimas digestivas, poderiam ser responsáveis em grande parte, pelo baixo valor biológico das proteínas de feijão.

A reduzida disponibilidade biológica da metionina de vários cultivares de feijões brasileiros foi confirmada por Sgarbieri e col. (1979). Neste estudo os valores de disponibilidade encontrados foram de 29,3; 34,7; 36,6 e 40,6% respectiva

mente para o Carioca, o Piratã-1, o Rosinha G2 e o Rico 23.

Antunes e Sgarbieri (1979b) demonstraram também uma grande queda da disponibilidade biológica da metionina e da cisteína quando o feijão Rosinha G2 foi estocado durante seis meses sob diferentes condições de temperatura e umidade relativa, a saber: 12°C e 52% UR; 25°C e 65% UR e; 37°C e 76% UR. Nessas condições a disponibilidade biológica da metionina caiu de 46,3% para 43,1; 38,2 e 27,6% e a de cisteína, de 51,6% para 45,8; 43,0 e 30,0%, respectivamente, para as três condições de estocagem mencionadas. Adição de metionina aos feijões estocados por seis meses nas três condições citadas, elevou os valores de PER de 0,66; 0,43 e 0,10 para 2,45; 2,46 e 2,40, respectivamente.

PROTEÍNAS TÓXICAS E ANTINUTRICIONAIS

As sementes de plantas da família *Leguminosae* podem apresentar maior ou menor toxicidade, dependendo da espécie considerada e do tratamento que precede sua ingestão. A natureza química dessas substâncias tóxicas e antinutricionais são bastante diversas (Liener, 1962, 1973, 1979). Entre essas substâncias incluem-se inibidores de enzimas digestivas, fito-hemaglutininas, substâncias bocígenas, antivitaminas, quelantes de elementos metálicos, fatores estrogênicos, aminoácidos tóxicos, substâncias causadoras do latirismo e do favismo, alcolóides e saponinas, entre outras.

Desse elenco de substâncias tóxicas, apenas os inibidores de enzimas digestivas e as fito-hemaglutininas são reconhecidamente de natureza protéica e, portanto, mais diretamente relacionadas com o presente estudo sobre as proteínas de feijão. Entre as proteínas inibidoras de enzimas digestivas, os inibidores de proteases têm merecido maior atenção por parte de bioquímicos e nutricionistas e, por este motivo, são as mais estudadas.

Osborne e Mendel (1917) observaram que a soja tinha que ser aquecida a fim de promover crescimento normal em ratos. Mais tarde Kunitz (1945) isolou da soja crua uma proteína que se combinava com a enzima digestiva tripsina, formando um complexo inativo. Nas quatro décadas decorridas desde os estudos de Kunitz, muitos trabalhos foram publicados sobre a ocorrência e as propriedades desses inibidores. Apesar do continuado interesse, a possível ação desses inibidores sobre o organismo animal ainda não foi completamente esclarecida (Liener e Kakade, 1969). Para alguns pesquisadores (Broth e col. 1960) não existia nenhuma dúvida de que a hipertrofia do pâncreas constituía o efeito fisiológico primário decorrente da ingestão de soja crua ou, do inibidor isolado (Nesheim e col. 1960). Segundo Broth e col. (1960), a hipertrofia do pâncreas conduzia a uma perda excessiva de proteína endógena secretada pelo pâncreas. Levando-se em consideração que essas proteínas pancreáticas são, principalmente, enzimas, ricas em aminoácidos sulfurados, o efeito resultante seria uma perda desses aminoácidos pelo orga

nismo. Isto explicaria o fato da ingestão de soja crua provocar um aumento da necessidade de metionina, que já é naturalmente limitante na proteína de soja. Foi importante a observação de que, a adição do inibidor de tripsina à soja tratada termicamente, não reduzia o PER e o crescimento ao mesmo nível observado com a soja crua, indicando que o tratamento térmico produzia um efeito maior que a simples inativação do inibidor de tripsina.

Após o reconhecimento dos inibidores de tripsina na soja e em várias outras leguminosas, passou-se a atribuir a essas proteínas, pela sua ação antiproteolítica, o atraso no crescimento verificado em animais que ingeriam a soja crua ou insuficientemente aquecida. Essa teoria da inibição da proteólise, como único fator responsável pelo atraso no crescimento perdeu muito de seu valor, quando se demonstrou que a incorporação de inibidor de tripsina em dietas contendo proteína pré-digerida ou aminoácidos livres, também produzia atraso no crescimento e hipertrofia do pâncreas (Liener e col. 1949; Desikachar e De 1947; Westfall e col. 1948). O mecanismo pelo qual o inibidor de tripsina induziria hipertrofia pancreática em alguns animais não foi adequadamente esclarecido.

Trabalhos mais recentes demonstraram que a secreção pancreática é controlada por mecanismo de retro-inibição "feed back", que depende da concentração de tripsina e de quimotripsina presentes, em um dado momento, no intestino delgado (Green e Lyman, 1972; Schneeman e Lyman, 1973; Lyman e col. 1974; Niess e col. 1972). Quando o nível dessas enzimas cai abaixo de uma

concentração crítica "treshhold value", o pâncreas é induzido a produzir mais enzima. A supressão da inibição retro-ativa poderá ocorrer quando a tripsina ou a quimotripsina formar complexos inativos com o inibidor. Acredita-se que o agente mediador neste mecanismo seja o hormônio colecistoquinina que é liberado pela mucosa intestinal, quando a concentração de tripsina cai abaixo do nível crítico. Esta interpretação aparece esquematicamente representada na figura 1.

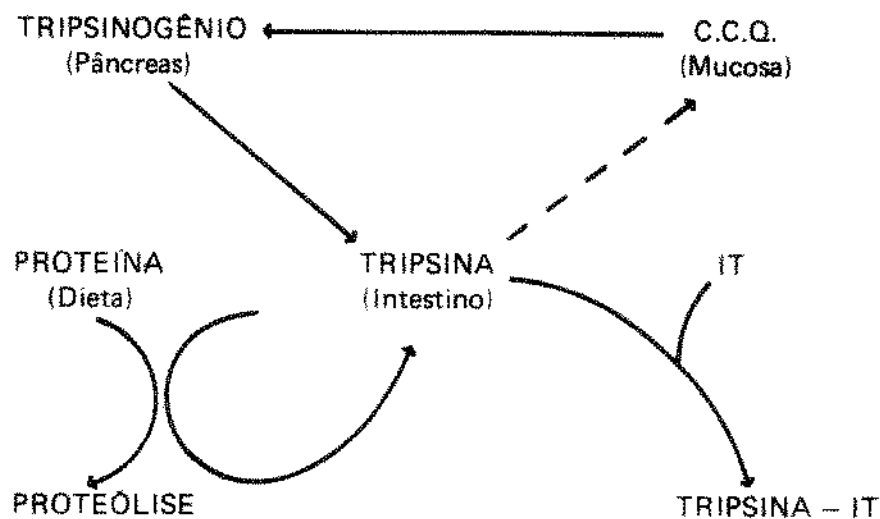


Fig. 1. Regulação da secreção da tripsina pelo pâncreas (Liener, 1979): C.C.Q., colecistoquinina; IT, inibidor de tripsina.

De acordo com Liener (1979), se o inibidor de tripsina fosse removido de um extrato de soja crua por cromatografia de afinidade, o extrato resultante era ainda capaz de causar inibição do crescimento e hipertrofia do pâncreas. Liener, estimou que cerca de 40% da inibição do crescimento e também 40% da hipertrofia pancreática, causada pela soja crua, podia ser atribuído ao inibidor de tripsina restando, portanto, 60% do efeito total sobre o crescimento e sobre o pâncreas, sem explicação. Segundo o mesmo autor, uma possível explicação para isto poderia advir do fato de que certas proteínas da soja e, possivelmente, de outras leguminosas, quando não desnaturadas se combinariam irreversivelmente com a tripsina, mesmo depois de removido o inibidor. Isto sugere a existência de proteínas nas sementes de leguminosas, resistentes à ação proteolítica das enzimas digestivas a exemplo das citadas por Seidl e col (1969) e Green e col. (1973). Essas proteínas agiriam de maneira sinérgica com o inibidor de tripsina estimulando o pâncreas e causando perda de aminoácidos sulfurados de origem endógena.

Rackis e col. (1975) verificaram não haver hipertrofia pancreática em ratos alimentados com soja em que 54% da atividade inibidora da tripsina havia sido destruída, verificando valores máximos de PER com apenas 80% de inativação do inibidor.

Outro fato ainda controverso diz respeito à importância fisiológica do inibidor em alimentação humana.

A tripsina humana parece existir sob duas formas: uma espécie catiônica que constituía o maior componente e, uma aniô

nica que representava menos de 1/3 da atividade total da tripsina do suco pancreático (Robinson e col. 1972; Figarella e col. 1975). A espécie aniônica (tripsina 2) era estequiometricamente inibida pelo inibidor presente na soja, enquanto que a tripsina catiônica (tripsina 1) que representava cerca de 2/3 da atividade total do pâncreas humano, era apenas fracamente inibida pelo inibidor da soja.

Feeney e col. (1969) testaram a atividade *in vitro* de inibidores de várias fontes sobre a tripsina humana. Encontraram que o inibidor proveniente de soja inibia fracamente a tripsina humana, enquanto que o de colostro bovino, o inibidor extraído do pâncreas bovino e do feijão "Lima Bean" inibiam fortemente a tripsina humana.

Além dos inibidores de proteases, a maioria das leguminosas e cereais contém em suas sementes substâncias denominadas fito-hemaglutininas ou lectinas. São substâncias que possuem em suas moléculas um centro ativo específico de combinação com carboidratos. Aglutinam seletivamente eritrócitos, *in vitro*, iniciam mitose em culturas de linfócitos humanos e podem aglutinar ou inativar células de tumores (Sharon e Lis, 1972). Contribuem, pelo menos em algumas espécies, para o baixo valor nutritivo e para a toxidez de sementes cruas (Liener, 1976). Nas leguminosas parecem estar envolvidas no processo de reconhecimento de bactérias fixadoras de nitrogênio ou poderiam funcionar na defesa das plantas contra a invasão de bactérias patogênicas (Bohloul e Schmidt, 1974; Lindemann e col. 1974).

Ainda não se tem conhecimentos exatos sobre o modo de ação das hemaglutininas *in vivo*. Um possível mecanismo de toxicidade foi proposto por Jaffé e Camejo (1961). Estes autores observaram *in vivo* uma significativa redução na absorção de nutrientes e, *in vitro*, uma diminuição de 50% na velocidade de absorção de glicose pela parede intestinal, de ratos alimentados com preparações aglutinantes obtidas de "Caraotas negras" (*Phaseolus vulgaris*). Com base nestas evidências propuseram que as hemaglutininas deveriam interagir com as células da mucosa intestinal causando um bloqueio parcial, não específico, na absorção de nutrientes.

Um outro tipo de efeito sobre as células intestinais foi sugerido por Jayne-Williams (1973) e por Jayne-Williams e Burgess (1974) após terem observado que o codorniz japonês, quando livre de germes intestinais, tolerava o efeito da Concanavalina A e da hemaglutinina de "Navy Bean" muito melhor que animais convencionais. Esses autores emitiram a teoria de que as ligações dessas hemaglutininas com as células da parede intestinal poderiam interferir com o mecanismo normal de defesa dessas células no sentido de permitir a entrada de bactérias do lume intestinal para a linfa, sangue e outros tecidos.

Quatro tipos de hemaglutininas foram diferenciadas em variedades de feijão por Jaffé e col. (1972, 1974). Aquecimento prolongado ou autoclavagem de feijões pré-embebidos em água destruiu a atividade hemaglutinante, bem como, a sua toxidez aguda. Jaffé e col. (1972) verificaram que a atividade hemaglutinante

sobre hemácias humanas ou de coelho era muito mais termolábil que a sua ação tóxica. Contudo, a atividade hemaglutinante sobre hemácias de sangue bovino tratadas com tripsina, era tão resistente à ação do calor quanto a sua ação tóxica (Jaffé e Brucher, 1972). Esta descoberta levou à conclusão de que o teste de hemaglutinação, usando hemácias de sangue bovino, previamente tripsinizadas, constitui um método útil para a detecção de variedades de feijão contendo hemaglutininas tóxicas, e, também, para se acompanhar o progresso de destruição desse fator tóxico em função do tratamento térmico.

Apesar das inúmeras tentativas de identificar e quantificar o efeito tóxico das diferentes proteínas antinutricionais das sementes de leguminosas, ainda existe muita controvérsia quanto à natureza da principal substância tóxica.

Turner e Liener (1975) conseguiram eliminar por cromatografia em coluna de concanavalina A-Sepharose, a atividade hemaglutinante de um extrato de farinha de soja crua. A atividade do inibidor de tripsina não era afetada por este tratamento. O extrato livre de hemaglutinina foi utilizado para alimentar ratos, obtendo-se um padrão de crescimento e PER que não diferiram significativamente daqueles obtidos com o extrato original contendo a hemaglutinina. Concluíram deste estudo que a hemaglutinina deveria exercer um papel relativamente pouco importante em relação aos efeitos antinutricionais encontrados na farinha de soja não aquecida.

Em trabalho semelhante, porém, com o feijão "Kidney

Bean", Pusztai e Palmer (1977) verificaram que a toxidez de um extrato cru desta variedade de feijão estava associada à hemaglutinina. A hemaglutinina foi isolada em colunas de fetuína-sepharose 4B, por cromatografia de afinidade. Quando se determinaram os NPU's em ratos que receberam rações com 5% de caseína adicionadas de diferentes quantidades de hemaglutinina isolada, verificou-se que a hemaglutinina exerceu um forte efeito inibitório sobre o crescimento, em conformidade com a seguinte equação: $NPU = NPU_{5\% \text{ caseína}} - 280x$, em que x representa a porcentagem de hemaglutinina na dieta (P/P). A importância da hemaglutinina em relação à toxidez do feijão foi confirmada nesta mesma pesquisa, pela verificação de que a introdução nas mesmas dietas, das proteínas de feijão isentas de hemaglutinina, não produziu nenhum efeito tóxico.

Kakade e Evans (1965) isolaram e fracionaram as proteínas do feijão "Navy Bean" de acordo com o método descrito por Honavar e col. (1962). Obtiveram cinco frações protéicas, todas elas exibindo maior ou menor capacidade de retardar o crescimento de ratos. A fração 4, extraída em 1% de NaCl e precipitada com sulfato de amônio a 75% de saturação, foi a que apresentou maior inibição do crescimento. Essa fração 4 continha atividade relativamente baixa de hemaglutinina e de inibidor de tripsina, levando os autores a postularem a existência de outras proteínas tóxicas nessa variedade de feijão, além do inibidor de tripsina e da hemaglutinina. Em trabalho posterior Kakade e col. (1968) testaram a capacidade da fração 4 de, modificar a velocidade

dade de síntese de proteínas em diversos tecidos, quando injetada intraperitonealmente em ratos. Verificaram que essa fração aumentava de 25% a capacidade de síntese de proteína pelo tecido hepático e inibia de 50% a mesma capacidade do tecido muscular. Por outro lado não exercia nenhum efeito sobre a síntese de proteínas no intestino delgado.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Ao contrário do que ocorreu com a soja, poucos são os estudos de purificação e caracterização das propriedades físico-químicas das proteínas de feijões do gênero *Phaseolus*.

Pant e Tulsiani (1969) estudaram a solubilidade das proteínas de três variedades de feijão (*P. vulgaris*) em água, cloreto de sódio, álcool e em solução de hidróxido de sódio, bem como em diferentes pH's, ajustados com soluções de HCl ou de NaOH. Verificaram que 74 a 82% do nitrogênio total da semente podia ser extraído com água mais cloreto de sódio, representando o nitrogênio não protéico e o proveniente das globulinas e albuminas. Através desse estudo, quantificaram a fração nitrogenada do grão de feijão como segue: globulina, 56 a 61%; albumina, 5,5 a 7,0%; prolamina, 1 a 3%; glutelina, 9 a 14%; substâncias nitrogenadas não protéicas, 10 a 15% e; não extraível, 4 a 9%.

No estudo da solubilidade, em função do pH, demonstraram que o pH de menor solubilidade variou entre 2,0 e 3,4 e que cerca de 80% da proteína podia ser extraída tanto em pH

ácido (pH 1,0) como em pH alcalino (pH 8,0 a 9,0).

Um estudo realizado em nosso laboratório com 60 variedades de *P. vulgaris*, Sgarbieri e col. (1978) revelou uma solubilidade para as proteínas, em solução a 2% de cloreto de sódio, que variou entre 68 a 85%, e uma proporção entre globulina e albumina de 1,0 a 3,3. Nesse mesmo estudo fez-se também a caracterização eletroforética, em gel de poliacrilamida, do número de proteínas das frações globulina e albumina. O número de bandas para a fração albumina variou entre um mínimo de quatro e um máximo de 14, e para a fração globulina, entre quatro e 12. A mobilidade eletroforética dessas proteínas, relativa ao corante azul de bromofenol, variou entre 0,09 e 0,93.

Com exceção de alguns inibidores de protease e de algumas hemaglutininas, são poucas as proteínas já isoladas, em elevado grau de pureza, a partir do grão de feijão.

Jaffé e Hannig (1965) usando as técnicas de diálise, precipitação com sulfato de amônio e eletroforese de fluxo-livre, separaram do feijão preto "Kidney Bean" (*P. vulgaris*) 11 frações protéicas das quais nove eram solúveis em água e duas em soluções salinas. Quatro dessas frações protéicas apresentaram atividade hemaglutinante. As duas frações insolúveis em água representaram cerca de 90% da proteína total extraída. As quatro frações com atividade hemaglutinante foram as que tiveram as menores mobilidades eletroforéticas. A de menor mobilidade, havia sido descrita anteriormente como "phaseolotoxina A",

com peso molecular 128.000 e ponto isoelétrico 4,9. Todas as frações analisadas continham açúcares e deram reações positivas na eletroforese para glicoproteína. Verificaram, ainda, que tanto as proteínas solúveis em água como as solúveis em solução salina eram muito resistentes à hidrólise pela pepsina e pela papaína.

Pusztai (1966) descreveu o isolamento e a purificação de duas proteínas a partir do feijão "Kidney Bean". Uma dessas proteínas representava 0,23% do nitrogênio total extraído do grão e continha vários açúcares na molécula, principalmente D-glicosamina e D-manose, além de pequenas quantidades de arabinose, xilose e fucose. Esta foi denominada de glicoproteína I. A outra proteína isolada por Pusztai, era um inibidor de tripsina, que não continha açúcares na molécula. Essas duas proteínas diferiram na composição de aminoácidos, principalmente no sentido de que a glicoproteína I era pobre em aminoácidos sulfurados mas rica em aromáticos, enquanto que o inibidor de tripsina continha alto teor de cistina (14,45%) e baixo teor de aminoácidos aromáticos e de valina.

Usando extração em pH 8,3 e precipitação em pH 5,0, Pusztai e Watt (1970) extraíram de "Kidney bean" uma glicoproteína (glicoproteína II) que, depois de purificada, representava cerca de 10% do nitrogênio total do grão. A purificação foi conseguida por eletroforese de alta voltagem e cromatografia em colunas de Sephadex G-200 e DEAE-celulose. Entre pH 2,2 e 3,4 essa proteína aparecia como um monômero de peso molecular

140.000 $\pm$ 2.000, enquanto que em pH entre 3,4 e 6,6, aparecia como um tetrâmetro de peso molecular 560.000. A glicoproteína II continha 4,46% de açúcares neutros, principalmente manose e xilose, e cerca de 1% de glicosamina na molécula. Era pobre em aminoácidos sulfurados e aromáticos e apresentou ponto isoeletrico ao redor de pH 5,4.

Uma fração globulínica, que representava 75% da proteína total do feijão mexicano "Negro Mecentral" (*P. vulgaris*), foi subfracionada por Ishino e Ortega (1975) em quatro componentes designados por eles, α , β , γ e δ , em ordem decrescente de mobilidade eletroforética no gel de poliacrilamida. Esses componentes representavam 50, 19, 10 e 12% da globulina total, respectivamente.

O componente α representava 38% da proteína total do grão sendo, aparentemente, a principal proteína de reserva. Continha 14,55% de nitrogênio, coeficiente de sedimentação 7,42S e peso molecular aproximado 170.000. Era uma glicoproteína que continha, 4,95% de carboidrato como manose e, 1,19% de hexosamina como glicosamina. O componente α bem como os componentes β e γ , sofreram dissociação em condições alcalinas (pH 12,5).

A pH 4,1, 62% da globulina permanecia solúvel em tampão de acetato de sódio com força iônica, $\mu = 0,5$. Os componentes β e γ pareciam formar complexos insolúveis durante a acidificação.

Sun e Hall (1975) extraíram sementes de *Phaseolus vul*

garis, var. americana "Tendergreen", com solução de ácido clorídrico e cloreto de sódio, pH 3,5. Pela diluição do extrato bruto conseguiram separar duas globulinas importantes que chamaram de G1 e G2. Em solução 0,5M de NaCl, ambas globulinas eram totalmente solúveis. Diluição, pela adição de 5 volumes de água destilada (- 0,08M de NaCl) resultou em precipitação de pelo menos 98% da globulina G1, enquanto que a G2 permaneceu em solução. A globulina G1 apresentou ponto isoelétrico entre os pH's 4,4 e 5,6 e a globulina G2 em pH 3,7. A globulina G1 foi considerada por esses pesquisadores a principal proteína de reserva do grão de feijão, sendo uma glicoproteína com 2,9% de hexosamina na molécula. No tocante à solubilidade, a globulina G1 começava a se dissolver em concentração 0,1M de cloreto de sódio aumentando a solubilidade até completa dissolução em solução 0,2M de NaCl. Considerável quantidade de G2 era solúvel em água deionizada, verificando-se completa dissolução em solução 0,05M de NaCl.

A suscetibilidade da globulina G1 à proteólise pela pepsina, tripsina e quimotripsina foi estudada por Romero e Ryan (1978). A extensão da proteólise da globulina G1 por essas enzimas proteolíticas foi inferior à observada para a albumina de soro bovino, em sua forma nativa. A eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS revelou em G1 um grande número de ligações peptídicas suscetíveis de hidrólise pela tripsina, enquanto que outras se mostraram resistentes à hidrólise por essa enzima. O pronunciado efeito do tratamento térmico sobre a proteo-

lise da globulina G1 sugeriu a existência de impedimentos conformacionais que dificultavam a hidrólise dessa proteína em sua forma nativa.

Dentre as proteínas dos grãos de leguminosas, as que têm sido mais intensamente estudadas do ponto de vista físico-químico e estrutural são as que exercem ação inibidora sobre as enzimas proteolíticas. Esses inibidores ocorrem não só nas sementes de leguminosas mas também, em vários cereais, bem como em alguns órgãos e fluídos de origem animal.

Alguns artigos de revisão cobrindo vários aspectos da química, bioquímica e fisiologia, relacionados com esses inibidores se encontram na literatura. Laskowski e Laskowski, Jr. (1954) descreveram a ocorrência, as propriedades físico-químicas e alguns parâmetros termodinâmicos das reações desses inibidores com a tripsina. Pusztai (1967) descreveu os principais inibidores encontrados em plantas tentando uma revisão crítica das possíveis implicações nutricionais desses inibidores em nutrição animal. Means e col. (1974) procuraram, à luz dos conhecimentos existentes sobre os vários inibidores, estabelecer as bases químicas e físico-químicas da ação desses inibidores sobre diversas enzimas proteolíticas. Um tratamento mais generalizado, incluindo a metodologia empregada na purificação e caracterização dos diferentes inibidores estudados, é dado por Kassell (1970).

Sem dúvida, de todos os inibidores de proteases que ocorrem em plantas e animais, os encontrados na soja foram os

mais estudados. Kunitz (1945, 1946) foi quem, pela primeira vez, isolou e cristalizou a partir da soja uma substância com forte atividade inibidora da tripsina. O próprio Kunitz (1947) estudou suas propriedades, mostrando uma forte afinidade pela tripsina e menor afinidade pela quimotripsina. Esse inibidor, hoje conhecido como inibidor de Kunitz foi caracterizado como uma α -globulina, precipitável com ácido tricloracético (TCA), não dialisável, peso molecular ao redor de 24.000 e ponto isoelétrico em pH 4,5. Era bastante estável em uma ampla faixa de pH's a baixas temperaturas. Acima de 30°C, já ocorria inibição, inicialmente reversível, tornando-se rapidamente irreversível com a elevação da temperatura.

Com a intensificação das pesquisas sobre a soja, vários pesquisadores (Wu e Scheraga, 1962; Rackis e col. 1962; Yamamoto e Ikenaka, 1967; Birk e col. 1967; Birk, 1968; Frattali e Steiner, 1969) descobriram outros inibidores de tripsina e de quimotripsina em extratos dessa leguminosa. Além do inibidor típico de Kunitz, pelo menos quatro outras formas de inibidores foram isoladas e descritas por esses autores, a partir da soja. Esses inibidores puderam ser diferenciados do inibidor original de Kunitz principalmente pelas diferenças encontradas nos pesos moleculares (8.000 a 24.000), na composição de aminoácidos (mais ricos em cistina), mais resistentes à desnaturação térmica, por serem resistentes à hidrólise pela pepsina, e por inibirem tanto a tripsina como a quimotripsina. O inibidor de peso molecular 8.000 ficou conhecido como inibidor de Bowman-

Birk (Frattali e Steiner, 1969), possuindo a propriedade de agregação ou de formar polímeros de pesos moleculares múltiplos de até 24.000. Há, portanto, a possibilidade e, algumas evidências experimentais, de que os inibidores que foram descobertos na soja depois do inibidor típico de Kunitz, poderiam ter sido formas múltiplas do composto de peso molecular 8.000. Aceitando essa hipótese, poder-se-ia classificar os inibidores da soja em dois tipos, a saber: inibidor de Kunitz (PM 21.000 a 24.000, baixo teor de cistina, termolábil, hidrolisável pela pepsina em pH 2,0); tipo Bowman-Birk (PM 8.000 a 24.000; elevado teor de cistina, termo-resistente, não hidrolisável pela pepsina e com forte atividade inibidora também contra a quimotripsina).

Além dos inibidores encontrados na soja, vários outros foram extraídos de outras leguminosas, e purificados.

Fraenkel-Conrat e col. (1952) isolaram do feijão "Lima Bean" (*Phaseolus lunatus*), um inibidor de tripsina que foi caracterizado como tendo peso molecular 10.000, resistente a extremos de pH, ao calor e à ação da pepsina. A composição em aminoácidos revelou que esse inibidor continha na molécula 16% de cistina e que era semelhante à queratina quanto à quantidade de ligações cruzadas do tipo (-S-S-). Essa mesma leguminosa foi estudada mais tarde por Jones e col. (1963) que conseguiram isolar e purificar, cromatograficamente, quatro proteínas com ação inibidora sobre a tripsina. Os pesos moleculares encontrados por esses pesquisadores para esses quatro inibidores foram 8.291, 8.408, 9.423 e 9.892. Essas proteínas não possuíam nem metionina e nem triptofânio nas moléculas. O conteúdo de cisti

na variou entre 17,1 e 20,2 gramas por 100g de proteína, para os quatro inibidores. A clivagem das ligações dissulfídicas por oxidação com ácido perfórmico ou pela redução com mercaptoetanol eliminava, completamente, a atividade inibidora.

Bowman (1948) reportou sobre o isolamento e a purificação parcial de um inibidor de tripsina a partir do feijão "Navy Bean" (*Phaseolus vulgaris*, L). Esse mesmo inibidor foi isolado e purificado, por ultrafiltração em gel de Sephadex e cromatografia em colunas de troca iônica, DEAE-celulose, por Wagner e Riehm (1967). Determinaram para o inibidor de "Navy Bean" um peso molecular de 23.000 e um volume específico parcial de 0,693. Quanto à composição em aminoácidos continha um teor muito alto (15%) de cistina, baixo teor de metionina, não contendo nem triptofânio e nem cisteína na molécula. Continha cerca de 1,7 moles de manose por mole de proteína. Esse inibidor combinava-se com a tripsina na proporção de 1:2, isto é, 1 mole de inibidor unia-se a 2 moles de tripsina.

O inibidor isolado e purificado por Pusztai (1966) a partir de *P. vulgaris* "Kidney Bean" foi posteriormente estudado (Pusztai, 1968) quanto às suas propriedades moleculares e inibidoras. Foram encontrados para esse inibidor pesos moleculares de 10.000, 14.000 e 15.100 ± 800 , dependendo da técnica e das condições empregadas para a determinação. Foi atribuído o peso molecular 10.000 como o mais provável, baseado na forte tendência à agregação evidenciada por essa proteína. O volume específico calculado pela composição de aminoácidos foi de 0,68. Ou

tras propriedades interessantes encontradas para esse inibidor foram: elevado teor de cistina (14,5%); elevada resistência térmica (90°C, 90 min); resistência à ação proteolítica da pepsina (pH 2,0, 37°C, 2h); forte atividade inibidora contra tripsina e quimotripsina, sendo os centros de ligação para essas enzimas independentes (double headed).

Belitz e col. (1972) fizeram um estudo eletroforético comparativo dos inibidores de três espécies de feijões, a saber: *Phaseolus vulgaris* var. nanus, *P. coccineus* e *P. lunatus*, encontrando em todos eles, cinco bandas de proteína de alta mobilidade em direção ao ânodo. As mobilidades relativas dessas bandas não foram idênticas nas três espécies porém, foram bastante semelhantes. Os pesos moleculares e as composições em aminoácidos desses inibidores também foram semelhantes. Todos apresentaram peso molecular entre 9.000 e 10.000 e inibiram fortemente tanto a tripsina quanto a quimotripsina. Foi mostrado que um dos inibidores isolados de *P. vulgaris* var. nanus (PVI₃) apresentava centros de ligação independentes para tripsina e para quimotripsina, a exemplo de outros inibidores já estudados.

Em um trabalho subsequente, Belitz e Fuchs (1973) estudaram a clivagem do inibidor PVI₃ pela tripsina e pela quimotripsina, isolando fragmentos ativos contra a tripsina e a quimotripsina, com centros ativos separados. Pelo exame dos fragmentos obtidos, após redução e carboximetilação, puderam provar que a ligação peptídica Lis²³-Ser²⁴ está envolvida no

centro de ligação com a tripsina, enquanto que Phe⁵²-Ser⁵³ está no centro de ligação com a quimotripsina. Foi também demonstrado que o centro de ligação para tripsina se localiza próximo da extremidade N-terminal da cadeia do inibidor, enquanto que o da quimotripsina está mais próximo da extremidade C-terminal.

A globulina isolada por Seidl e col. (1969) denominada globulina E, representava 30% da proteína extraível do feijão "Kidney Bean" e possuía atividade inibidora ou resistência à ação de várias enzimas proteolíticas. A sua atividade específica era baixa em relação aos inibidores de tripsina já descritos, porém a resistência à proteólise não foi eliminada pelo tratamento com uréia ou pelo calor. Essa proteína, que foi denominada inibidor de proteinase para diferenciá-la dos inibidores de tripsina, apresentava-se com um peso molecular ao redor de 200.000 que podia variar em função do pH e de sua concentração na solução. A resistência à inativação térmica e à ação de uréia, não pode ser atribuída às ligações dissulfídicas, uma vez que essa proteína não possuía cistina em sua composição.

Devido à enorme diversidade encontrada entre os inibidores de proteases de origem vegetal quanto à composição, peso molecular e propriedades físico-químicas, tentaremos em seguida compilar em um quadro as principais propriedades dos inibidores estudados até o presente com algum detalhe. Essa comparação das propriedades dos inibidores, oriundos de diferentes fontes permitirá, talvez, uma melhor racionalização e compreensão de suas propriedades mais fundamentais.

Pela inspeção dos dados do Quadro I, torna-se evidente a grande diversidade de propriedades encontradas entre os inibidores de tripsina e/ou quimotripsina de origem vegetal. Torna-se, assim, muito difícil qualquer racionalização ou classificação desses inibidores de acordo com as suas propriedades.

Algumas comparações interessantes poderão ser feitas com base nos dados do Quadro I. Os inibidores isolados de leguminosas do gênero *Phaseolus* apresentam como propriedades comuns, alto teor de cistina e, praticamente, nenhuma cisteína e nenhum triptofânio na molécula, o que sugere um elevado número de ligações dissulfídicas. Quanto ao peso molecular, os valores encontrados para os inibidores extraídos de *Phaseolus* estão entre 9.000 e 23.000. No Quadro I, o peso molecular do inibidor do feijão "Lima Bean" (*P. lunatus*) é de 9.423, existindo três ou quatro inibidores isolados dessa espécie com pesos moleculares ao redor de 9.000. Os inibidores de *P. vulgaris* variedades "Kidney Bean" (KBI) e nanus (PVI₃), também foram caracterizados com peso molecular ao redor de 10.000. Já, o inibidor do feijão "Navy Bean" (NBI) apresentou peso molecular de 23.000. Todos esses inibidores isolados de *Phaseolus* apresentaram, em comum, elevada resistência térmica, resistência à ação da pepsina, forte poter inibidor sobre a tripsina e sobre a quimotripsina. Aparentemente, todos esses inibidores possuem em suas moléculas centros de ligação independentes para a tripsina e para a quimotripsina.

O inibidor (AA) da soja, também conhecido como inibi

dor de Bowman-Birk, possui peso molecular ao redor de 20.000 e todas as propriedades mencionadas como características dos inibidores encontrados em *Phaseolus*. Não está ainda excluída a possibilidade de que o inibidor AA seja um dímero, formado por monômeros de peso molecular 10.000.

Por outro lado, o inibidor descoberto e isolado da soja por Kunitz (SBTI) é formado de um único polipeptídeo de peso molecular ao redor de 22.000, contendo baixo teor de cistina e um teor mais elevado de triptofânio. É termolábil e sofre degradação pela pepsina em pH ácido. Sua ação inibidora se faz sentir principalmente sobre a tripsina. Esse inibidor da soja apresenta algumas propriedades semelhantes aos inibidores encontrados na cevada (BTI) que inibe a tripsina, e o isolado da batata doce (PCI) que inibe, preferencialmente, a quimotripsina. Os três inibidores são degradáveis pela pepsina e possuem um teor mais baixo de cistina na molécula. Os inibidores de cevada e de batata são mais resistentes ao tratamento térmico que o de Kunitz, embora sejam menos resistentes que os isolados de *Phaseolus*. Outra diferença dos inibidores de cevada e de batata, em relação ao de Kunitz, se refere ao peso molecular. O de cevada apresentou peso molecular 14.000 e o de batata 38.000. Este último parece ser um tetrâmero, cujos monômeros teriam pesos moleculares entre 9.000 e 10.000.

Quadro I. Propriedades de alguns inibidores de tripsina e/ou quimotripsina, de origem vegetal.

Propriedades	SBTI ¹	AA ²	LBI ³ (IV)	KBI ⁴	NBI ⁵	PVI ⁶ ₃	BTI ⁷	PCI ⁸ (I)
Peso molecular	21.700	20.435	9.423	10.000	23.000	9.330	14.400	38.000
Cistina (resíduos/M)	4	34	14	12	30	12	12	7
Serina (resíduos/M)	13	24	13	12	35	12	11	15
Triptofânio (resíduos/M)	2	0	0	< 1	0	?	?	?
Volume específico par- cial ($\bar{V}$)	0,7-0,74	0,69	?	0,68	0,7	?	0,72	?
pH isoelétrico (P.I.)	4,5-4,6	4-4,2	> 3,6	5	?	?	?	?
Termo-resistência	L	R	R	R	?	R	R	+ R
Degradável pela pepsina	Sim	Não	Não	Não	?	Não	Sim	Sim
Ação sobre pepsina	Não	Não	Não	Não	?	Não	Não	Não
Enzima inibida ^a	Tr	Tr, QTr	Tr, QTr	Tr, QTr	Tr, QTr	Tr, QTr	Tr	> QTr

¹ inibidor de Kunitz (Birk, 1968); ² inibidor de Bowman-Birk (Birk, 1968); ³ inibidor IV do feijão "Lima Bean" (Birk, 1968; Kassell, 1970); ⁴ inibidor do feijão "Kidney Bean" (Pusztai, 1966, 1968; Kassell, 1970); ⁵ inibidor do feijão "Navy Bean" (Wagner e Riehm, 1967; Kassell, 1970); ⁶ inibidor de *P. vulgaris* var. nanus (Belitz e col. 1972; Belitz e Fuchs, 1973); ⁷ inibidor da cevada (Kassell, 1970); ⁸ inibidor da batata doce (Kassell, 1970); ^a Tr - tripsina; QTr - quimotripsina.

VARIEDADE

A variedade estudada foi a denominada Rosinha G2, selecionada no Instituto Agronômico de Campinas. As sementes fornecidas pela Seção de Leguminosas do IAC, eram da região de Campinas e provenientes das safras de 1977, 1978 e 1979.

EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Para extração das proteínas os grãos foram inicialmente moídos em moinho de martelo até granulometria de 70 mesh. As extrações foram sempre feitas usando a relação farinha/solvente 1/5 (P/V), exceto para os casos em que o efeito da variação dessa relação foi estudado. Depois de feita a suspensão de farinha integral no solvente, agitava-se em média duas horas à temperatura ambiente do laboratório ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$), seguindo-se centrifugação a $12.000 \times G$ por 30 min a temperaturas entre 5 e 10°C , em uma centrífuga refrigerada Sorvall RC2-B. Na maioria dos casos, o resíduo da primeira extração foi re-extraído, uma ou mais vezes, com o mesmo solvente ou com solvente diferente. Os sobrenadantes das diferentes extrações, após centrifugação, constituíam os extratos brutos.

Para o estudo da extratibilidade das proteínas em função do pH, tomou-se em cada ensaio 5g de farinha integral que foram suspensas em 100ml de água destilada e o pH ajustado com

solução 2N de HCl ou de NaOH. Os valores de pH foram ajustados entre 2,0 e 10,0. Após ajustar o pH, a suspensão foi agitada durante 2 horas à temperatura do laboratório ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$), centrifugada ($12.000 \times G$, 30 min) e a proteína foi determinada no sobrenadante pela reação do biureto, lendo-se a absorbância a 540nm.

OBTENÇÃO DE FRAÇÕES PROTÉICAS A PARTIR DO EXTRATO BRUTO

O extrato bruto (água mais cloreto de sódio) era inicialmente submetido à diálise em água destilada (4°C , 48-72h), utilizando-se membranas de celulose (Sigma Chemical Co; A. Thomas Co.) com capacidade de excluir substâncias com pesos moleculares até 8.000. A liofilização da suspensão obtida após diálise, forneceu o isolado protéico total (IPT). Centrifugação ($12.000 \times G$, 4°C , 30 min) das suspensões após diálise resultava em um precipitado e um sobrenadante. O precipitado era re-extraído com água destilada, centrifugado e, os sobrenadantes eram combinados. A liofilização das substâncias solúveis em água forneceu a fração F_1 . A fração insolúvel em água (F_2) era também liofilizada. Para obtenção da fração globulina (F_3) a fração F_2 , antes da liofilização, foi re-extraída com um volume de solução 0,5M de NaCl igual ao volume usado para obtenção do extrato bruto. A solução salina era dialisada em água destilada e em seguida liofilizada (F_3). O resíduo insolúvel em solução 0,5M de NaCl, depois de dialisado e liofilizado, constituiu a fração F_4 . Quando a fração solúvel em água, após a diálise (albumina), foi submetida ao aquecimento (97°C , 15 min) formou-se

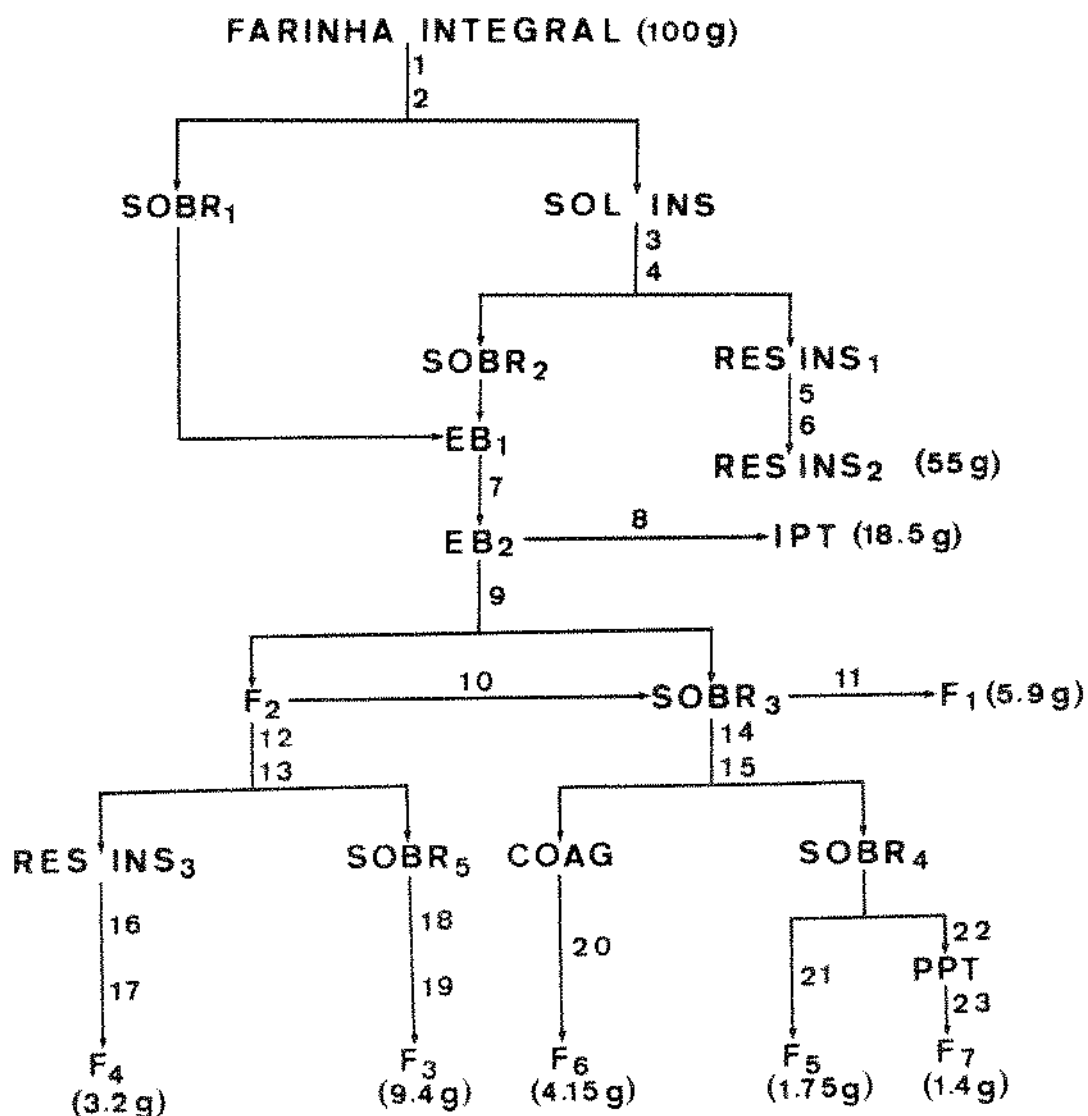


Fig. 2. Extração e fracionamento das proteínas de feijão: 1. extração com água (500ml); 2. centrifugação (12.000 x G, 30 min); 3. extração NaCl 0,5M (500ml); 4. centrifugação; 5. re-extrações com água; 6. liofilização; 7. diálise; 8. liofilização; 9. centrifugação; 10. re-extração com água; 11. liofilização; 12. re-extração NaCl 0,5M; 13. centrifugação; 14. tratamento térmico (97°C, 15 min); 15. centrifugação; 16. diálise; 17. liofilização; 18. diálise; 19. liofilização; 20. liofilização; 21. liofilização; 22. precipitação com (NH₄)₂SO₄, 0.65 saturação; 23. diálise; 24. liofilização.

um precipitado (F_6) constituído pelas albuminas coaguláveis, enquanto que o sobrenadante, após a centrifugação ($12.000 \times G$, 30 min), era constituído pelas albuminas não coaguláveis (F_5). Adição de sulfato de amônio à solução de albuminas não coaguláveis (F_5) até 0,65 de saturação resultava no precipitado (F_7).

Na figura 2, aparece um esquema geral da extração, e do fracionamento das proteínas do extrato bruto, com base nas diferenças de solubilidade e de coagulabilidade.

PURIFICAÇÃO DOS INIBIDORES DA TRIPSINA E DA QUIMOTRIPSINA.

A purificação dos inibidores foi feita a partir da fração F_5 , albumina não coagulável ($97^{\circ}C$, 15 min), pela precipitação com sulfato de amônio, 0,65 de saturação, ultrafiltração em colunas de Sephadex G-100 e G-50 e cromatografia de troca iônica em colunas de DEAE-celulose.

O gel de Sephadex foi preparado para as colunas, lavando-se, inicialmente, com solução 0,5M de HCl, em seguida com água até eliminar o ácido, depois com solução 0,5M de NaOH, seguido de lavagens sucessivas com água para eliminar o NaOH. Durante as lavagens procurou-se eliminar os grânulos muito finos através de sifonação. Em seguida, o gel era equilibrado com o tampão de fosfato de sódio 0,01M, pH 7,6, através de lavagens sucessivas. O empacotamento das colunas era feito por gravidade. Em todos os experimentos, exceto na determinação do peso molecular, usaram-se colunas com camisa de circulação de água a $4^{\circ}C$. Nos experimentos para determinação do peso molecular, a ultrafiltração foi conduzida à temperatura do laboratório, de $24 \pm 2^{\circ}C$. O mesmo ciclo de tratamento, com ácido e base, foi feito

todas as vezes que se fez necessário a regeneração do gel.

Para a preparação da resina de DEAE-celulose procedeu-se como segue: a) Suspensão em solução contendo 0,25M de NaCl e 0,25M de NaOH; b) duas lavagens com água destilada; c) suspensão em solução 0,25M de HCl; d) lavagens com água até eliminação completa dos íons cloreto; e) suspensão em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,6; f) equilibrar com tampão fosfato de sódio 0,01M pH 7,6, lavando, pelo menos 5 vezes, com o mesmo tampão.

O tamanho da coluna e as condições empregadas para a eluição serão especificadas na legenda da figura de cada experimento.

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DA TRIPSINA HUMANA

Tripsina humana, parcialmente purificada, foi obtida a partir de pâncreas com seis a oito horas *postmortem*, seguindo as etapas do isolamento e purificação descritos por Travis e Roberts (1969), até a precipitação com sulfato de amônio (precipitado entre 0,2 - 0,8 de saturação), diálise e liofilização. Seguiu-se a ativação do precipitado liofilizado, em solução 0,1M de borato de sódio, contendo 0,05M de CaCl_2 , 12h a 4°C.

MÉTODOS ANALÍTICOS

PROTEÍNA. O teor de proteína das amostras foi, na maioria dos casos, determinado pelo método semimicro-Kjeldahl, como

descrito no AOAC; 2.23, (1955). A porcentagem de nitrogênio foi sempre multiplicada pelo fator 6,25 para conversão em proteína.

Em alguns casos usou-se a reação do biureto, segundo o procedimento de Weichselbaum (1946).

NITROGÊNIO NÃO PROTÉICO. Foi determinado na fração do extrato bruto, solúvel em solução a 10% de ácido tricloracético (TCA), pelo procedimento de Becker e col. (1940).

COMPOSIÇÃO CENTESIMAL APROXIMADA. Foi determinada para as várias amostras utilizadas nos ensaios biológicos pelos procedimentos descritos no AOAC, 7.003, 7.010, 7.048 (1970) para umidade, cinza e extrato etéreo, respectivamente, e pelo AOAC, 7.054 (1975) para fibra crua.

AÇÚCARES TOTAIS. A determinação dos açúcares totais foi feita utilizando o reagente fenol-ácido sulfúrico pelo método de Dubois e col. (1956). Os resultados foram expressos em porcentagem de manose.

AMINOÁCIDOS. Foram determinados pelo método de Spackman e col. (1958), em um analisador 120C da Beckman. O triptofânio foi determinado pelo método colorimétrico de Spies (1967) e a metionina pelo procedimento de Lunder (1973) e de Jamalian e Pellet (1968). O triptofânio foi também determinado no inibidor purificado, após hidrólise alcalina com hidróxido de bário (Blackburn, 1968).

ATIVIDADE DA TRIPSINA, DA QUIMOTRIPSINA E DOS INIBIDORES.

A atividade da tripsina, tanto sobre caseína como sobre benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) foi determinada pelo método de Kakade e col, (1969). Uma unidade de atividade trípica foi definida como a variação de 0,01 na absorbância a 280 e a 410nm para a caseína e BAPNA como substrato, respectivamente. A atividade da quimotripsina foi determinada somente sobre a caseína, usando o método de Kakade e col. (1970). A unidade de atividade da quimotripsina foi definida da mesma maneira que para a tripsina.

A atividade inibidora era determinada pela diferença entre a atividade enzimática, na ausência e na presença dos inibidores, tanto para tripsina como para a quimotripsina. A atividade inibidora foi expressa, portanto, em unidades de tripsina ou de quimotripsina inibidas.

ATIVIDADE DA DESIDROGENASE LÁTICA. A atividade da desidrogenase láctica (LDH) foi determinada pela medida da absorbância a 340nm do dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NAD) reduzido, usando-se piruvato como substrato de acordo com Neilands (1952). As medidas foram feitas em um espectrofotômetro modelo 356, Perkin-Elmer. A LDH usada foi de músculo cadíaco de bovino de procedência Sigma, tipo III cristalina com 400-600 unidades de atividade por miligrama de proteína.

IDENTIFICAÇÃO DOS AÇÚCARES. Para a identificação dos açúcares neutros da fração albumina e do inibidor purificado, as amostras (1 a 2g) foram inicialmente hidrolisadas por tempos

diferentes, isto é (6, 10 ou 16h) em 100 a 200 ml de solução 0,5M de HCl, a 100°C. O hidrolisado foi filtrado e evaporado (45°C) à pressão reduzida para eliminar o HCl. O concentrado livre de HCl foi colocado em uma coluna de 1,5 cm de diâmetro contendo 25 cm de Amberlite IR-45 (OH⁻) na camada superior e 30 cm de Amberlite IR-120 (H⁺) na inferior. O material eluído, depois de concentrado, foi utilizado para a identificação dos açúcares.

Foram feitas cromatografias em papel Whatman nº 1 e em placas com camadas delgadas de Sílica Gel-G (tipo 60) da Merck. A cromatografia em papel foi no sentido descendente, usando-se como solvente, acetato de etila: piridina:água (8:2:1 V/V) e como revelador, p-anisidina-ácido ftálico (Krebs e col. 1969). A cromatografia em placas de sílica gel foi no sentido ascendente. As placas foram inicialmente impregnadas com solução 0,02M de acetato de sódio. O solvente usado foi, clorofórmio:metanol (60:40 V/V) e o revelador, p-anisidina-ácido ftálico.

Os açúcares neutros foram identificados, também, por cromatografia em fase líquido/gasosa, de seus derivados trimetilsililados (TMS). A produção dos derivados sililados foi feita de acordo com o procedimento descrito por Sweeley e col. (1963). A análise foi feita em um cromatógrafo Pye UNICAM série 104, detetor de ionização de chamas, temperatura programável, munido de uma coluna cromatográfica de seis pés por 0,25 polegadas de diâmetro, contendo 10% de Apiezon L sobre chromosorb W. A programação usada para cada análise está especificada na legenda do cromatograma correspondente.

PROTEÓLISE ENZIMÁTICA. O grau de proteólise produzido pela pepsina e pelo preparado comercial pancreatina (Sigma Chemical Co.) foi determinado na farinha integral, nas diferentes frações protéicas isoladas e nos resíduos insolúveis após extração das proteínas, seguindo, basicamente, o procedimento descrito por Akeson e Stahmann (1964). As determinações foram feitas nas amostras sem nenhum tratamento térmico e após 5, 10, 15, 30 e 60 min de aquecimento a 97°C.

SULFITÓLISE. A sulfitólise das proteínas das frações albumina e globulina isoladas do feijão Rosinha G2 foi efetuada em pH 9,0 seguindo o procedimento de Cole (1967).

OXIDAÇÃO COM ÁCIDO PERFÓRMICO. A oxidação dos inibidores purificados (IG-50) foi feita segundo o procedimento descrito por Hirs (1967).

DOSAGEM DE GRUPOS SULFIDRILOS. A determinação de grupos sulfidrilos livres, nos inibidores purificados e na glutathione, foi feita espectrofotometricamente, pela diminuição da absorbância da N-ethylmaleimida (Sigma) a 300nm, devido a sua reação com os grupos sulfidrilos da amostra. As condições da reação, bem como, o cálculo do número de grupos sulfidrilos (μ moles) consumidos durante incubação foi de acordo com Alexander (1958).

ELETROFORESE. As eletroforeses foram executadas em tubos verticais (0,9 x 9,5cm) contendo gel de poliacrilamida.

As eletroforeses em gel simples de poliacrilamida foram

ram feitas segundo o método de Davis (1964), ligeiramente modificado (Constantinides e col. 1979). Os reagentes para a eletroforese foram todos de procedência Eastman Kodak ou British Drug House (BDH). O gel inferior continha 8% de poliacrilamida preparada a partir das seguintes soluções: a) 60g de acrilamida e 0,5g de NN-metilenobisacrilamida (BIS) em 130ml de água; b) tampão TRIS-HCl 3M, pH 8,8 contendo 0,23% de NNN'N'-tetrametiletlenodiamina. Para cada tubo foram misturados 2,44 e 2,62ml de soluções a e b, respectivamente, mais 2,44ml de água destilada, além de 5ml de uma solução 0,14% de persulfato de amônio. O gel superior continha 3% de poliacrilamida, preparada a partir das soluções: a) 10g de acrilamida e 2,5g de BIS em 160ml de água destilada; b) 4mg de riboflavina em 100ml de água; c) tampão TRIS-HCl 0,5M, pH 6,8, contendo 0,46% de NNN'N'-tetrametiletlenodiamina.

As quantidades dessas soluções utilizadas para cada tubo foram, 1, 0,5, 0,5ml de a, b e c, respectivamente, juntando-se ainda, à mistura 0,4ml de água destilada. A polimerização era auxiliada pela exposição dos tubos à luz fluorescente e se verificava em aproximadamente 15 minutos. Para os eletrodos foi utilizado tampão TRIS-glicina 0,05M, pH 8,2. O tampão em contato com o gel superior continha duas ou três gotas do corante azul de bromofenol, como indicador. As soluções das amostras (1mg/ml) adicionava-se ainda 2% de sacarose para aumentar a densidade, evitando a sua mistura com o tampão, quando aplicadas no topo do gel superior. Os eletrodos dos compartimentos superior e in

ferior eram conectados a uma fonte (Ortec modelo 4100) aplicando-se uma corrente de 2mA/tubo, até que o corante atingisse o gel inferior, aumentando-se, então, para 5mA/tubo até o fim da corrida, que durava aproximadamente 2 horas.

Para a revelação das bandas de proteína os géis eram retirados dos tubos e colocados em uma solução contendo 1% de amido Schwartz e 7,5% de ácido acético glacial, durante 15 minutos. A eliminação do excesso de corante era feita por lavagens sucessivas dos géis com solução de ácido acético a 7,5%.

Na eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), utilizou-se o método de Weber e Osborn (1969), adaptado por Constantinides e col. (1979). As proteínas utilizadas como padrão eram de procedência Sigma e consideradas de alto grau de pureza. As amostras (1mg/ml) foram dissolvidas em tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,0. Aliquotas de 150 μ l das soluções de proteína foram misturadas com 50 μ l de uma solução de tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,0, contendo 4% de SDS (P/V) e 4% de mercaptoetanol (V/V). Essa mistura era incubada a 37°C durante 2 horas. Após incubação tomavam-se 25 μ l das soluções pré-incubadas às quais eram adicionados 75 μ l da seguinte mistura: solução a 0,05% de azul de bromonofenol, 0,5ml; solução tampão de fosfato de sódio 0,001M pH 7,0, 1ml; 2-mercaptoetanol, 100 μ l e; glicerol, 20 gotas. Aplicavam-se 100 μ l da mistura final no topo do gel. Utilizou-se nos eletrodos, tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,0 contendo 1g/l de dodecil sulfato de sódio. A amperagem era mantida a 5mA/tubo durante

rante toda a corrida. No final, os géis eram removidos dos tu
bos e corados em solução de "Coomassie Brilliant Blue R-250", du
rante 3 horas. O excesso de corante era eliminado através de la
vagens do gel, com uma solução do mesmo corante contendo, 5%
de metanol e 7,5% de ácido acético glacial. A mobilidade eletrofor
ética, relativa ao azul de bromonofenol, foi calculada para
as proteínas padrões e para as amostras.

ISOELETROFOCALIZAÇÃO. A isoeletrofocalização, dos inibido
res purificados, foi feita em gel de poliacrilamida contendo uma
mistura de anfólitos LKB (pH 3,5 a 10,0). Para a obtenção do
gel fez-se, inicialmente, uma mistura na seguinte proporção: a)
0,8ml de uma solução contendo 1ml de NNN'N'-tetrametiletilenodiam
ina em 10ml de água destilada; b) 3ml de uma solução contendo,
30g de acrilamida mais 0,8g de BIS, em 100ml de água destilada;
c) 0,3ml de solução de anfólitos. Para cada tubo utilizaram-se
0,5ml dessa mistura, 0,1ml da solução de inibidor (1mg/ml),
0,2ml de uma solução a 0,5% de persulfato de amônio e 0,7ml de
água destilada.

O compartimento do eletrodo superior (cátodo) continha
uma solução a 2% de NNN'N'-tetrametiletilenodiamina e o infe
rior (ânodo), uma solução a 2% de ácido fosfórico. Iniciava-se
a eletroforese com 75V e 1,5mA/tubo. Quando a amperagem caía
para 0,5mA/tubo deixava-se mais uma hora a 100V. O tempo total
da corrida era de aproximadamente 4 horas. Terminada a corrida,
os géis eram removidos dos tubos e cortados em segmentos de
0,5cm que eram colocados em tubos de ensaio, contendo 1ml de

água destilada. Depois de 24 horas efetuou-se a determinação da atividade do inibidor, no eluado das diferentes secções do gel. Paralelamente, foi corrido um gel sem amostra, que foi cortado e tratado da mesma maneira, lendo-se, após 24h, os pH's correspondentes às diversas secções do gel.

COEFICIENTE DE SEDIMENTAÇÃO. Foi determinado pelo método de Martin e Ames (1961), adaptado para as condições do laboratório (Constantinides e col. 1979). Utilizou-se um sistema de formação de gradiente de sacarose construído em acrílico pela firma Permatron S.A., São Paulo. O gradiente foi obtido com 2,5ml de solução a 20% de sacarose no compartimento da direita e 2,5ml de solução a 5% de sacarose no compartimento da esquerda. O gradiente de concentração era coletado em tubos de nitrato de celulose com capacidade para 5,5ml. No topo de cada tubo colocava-se 0,1ml de solução, contendo 0,1mg de desidrogenase láctica (LDH, Sigma) mais 0,1mg de inibidor purificado. Os tubos foram colocados no rotor SW-65 da ultracentrífuga modelo L-75 Beckman e centrifugados a 4°C, 175.000 x G por 16 horas. Após a centrifugação, os tubos foram perfurados pelo fundo e o gradiente fracionado em 10 gotas por tubo (~ 0,2ml).

O coeficiente de sedimentação para os inibidores foi calculado, relacionando-se o coeficiente de sedimentação da LDH (7,4) com os deslocamentos relativos da LDH e dos inibidores no gradiente de densidade (fig. 19). Conhecendo-se o coeficiente de sedimentação dos inibidores, calculou-se o peso molecular pela relação seguinte:

$$\frac{L_I}{L_{LDH}} = \frac{S_{20,W,I}}{S_{20,W,LDH}} = \left(\frac{M_I}{M_{LDH}} \right)^{2/3}$$

MÉTODOS DE AVALIAÇÃO NUTRICIONAL

QUOCIENTE DE EFICIÊNCIA PROTÉICA (PER). Para a determinação do PER, usaram-se dietas com 10% de proteína, 8% de óleo vegetal, 4% de mistura mineral, 2% de mistura vitamínica, 2% de fibra (Hyflo Super-cel, Fisher) e o restante, carboidrato. A fibra era omitida quando os ingredientes já continham fibra em sua constituição. A soma dessas porcentagens era elevada a 100% com carboidrato. Sempre que possível, 25% dos carboidratos era fornecido como sacarose e 75% como amido. O procedimento geral do ensaio foi o descrito no AOAC; 43.183 (1975). A mistura salina foi preparada segundo Rogers e Harper (1965) e a mistura vitamínica de acordo com a Nutritional Biochemicals Corporation (1977/78).

BALANÇO DE NITROGÊNIO. O ensaio de balanço de nitrogênio foi feito, basicamente, de acordo com Mitchell (1923). Utilizaram-se em cada ensaio cinco ratos machos da linhagem Wistar pesando, cada um, de 38 a 43g. Os animais foram mantidos individualmente em gaiolas metabólicas durante 8 dias. Os primeiros cinco dias foram considerados de adaptação às dietas, não sendo coletadas nem fezes, nem urina. Nos últimos três dias, fezes e urina foram coletadas e analisadas para nitrogênio total pelo método semimicro-Kjeldahl. Foram determinados para cada rato e

para cada dieta utilizada a quantidade total de nitrogênio ingerido e as quantidades totais excretadas nas fezes e na urina. A digestibilidade aparente foi calculada como a relação entre o nitrogênio absorvido e o nitrogênio ingerido, expresso em porcentagem. O valor biológico aparente foi calculado pelo quociente do nitrogênio retido no organismo pelo nitrogênio absorvido, expresso, também, em porcentagem.

ÍNDICE DE UTILIZAÇÃO PROTÉICA (NPU). Foi determinado em ratos machos recém-desmamados, da linhagem Wistar pesando de 37 a 42g. Utilizaram-se 10 animais em cada grupo, que foram mantidos em gaiolas individuais, recebendo dieta com 5% de caseína e água *ad libitum*, por um período de 10 dias. O cálculo do NPU foi feito com base no conteúdo de água das carcaças dos animais, dos grupos que receberam as dietas com 5% de proteína e do grupo que permaneceu em dieta aprotéica, segundo o método de Miller e Bender (1955).

METIONINA DISPONÍVEL. As porcentagens de metionina biologicamente disponível na farinha, em várias frações protéicas e no resíduo da extração das proteínas, foram determinadas através de ensaios biológicos. Em cada ensaio foram utilizados 20 ratos machos da linhagem Wistar (35 - 40g) que foram subdivididos em cinco sub-grupos com aproximadamente o mesmo peso. Todos os animais receberam uma dieta base contendo 10% de proteína, exclusivamente de feijão. Todos os demais nutrientes foram adicionados de acordo com as necessidades do rato. Para o en

saio de metionina disponível, um dos grupos recebeu apenas a dieta basal, enquanto que às dietas dos outros quatro sub-grupos foram adicionados, 0,1, 0,2, 0,4 e 0,6% de DL-metionina em base protéica. Adicionou-se ainda, em todas as dietas, 1% de L-cisteína, também em base protéica.

Durante a experiência que durou 10 dias, os animais receberam dieta e água *ad libitum*. O consumo de dieta e o ganho de peso no fim do período experimental foram registrados. Os ganhos de peso foram colocados em um gráfico em função das quantidades de metionina adicionada. Nesse gráfico as médias de ganho de peso eram lidas na ordenada (eixo y) e as quantidades de metionina, na abscissa (eixo x). Os pontos experimentais, incluindo o da dieta base (zero de metionina adicionada) geraram uma reta, nas condições do experimento. O prolongamento dessa reta até a intersecção com o eixo x (zero de adição) permitiu a leitura direta da quantidade de metionina disponível na proteína de feijão. A porcentagem de disponibilidade foi calculada a partir do conhecimento do teor de metionina total na fração protéica. A metionina total das amostras utilizadas nesses ensaios de disponibilidade foi determinada pelo método da oxidação da proteína com ácido perfórmico, antes da hidrólise ácida (Jamalian e Pellet, 1968).

EXTRATIBILIDADE DAS PROTEÍNAS EM FUNÇÃO DO pH

A extratibilidade das proteínas em função do pH do meio solvente está representada na figura 3. Nesse experimento o pH variou entre 2,0 e 9,0, podendo-se verificar que a menor extratibilidade encontrada foi em pH 4,0. Entre 4,0 e 5,5 o aumento de extratibilidade foi muito pequeno, elevando-se, porém, rapidamente em pH mais alcalino. Em pH's abaixo de 4,0 a solubilidade aumentou também rapidamente, com o abaixamento do pH, não atingindo, porém, extratibilidade tão elevada quanto em meio alcalino.

Cumprе esclarecer que essa solubilidade elevada em meio alcalino, perto de 100% em pH 9,0 é aparente, uma vez que a determinação da proteína no extrato bruto foi feita, nesta série de experimentos, pela reação do biureto que superestima a concentração de proteína, em extrato alcalino de feijão. Essa interferência constatada na reação do biureto em extratos de feijão, em condições alcalinas, poderá ser devida à oxidação de substâncias fenólicas existentes na semente. Esse fato levou ao abandono da reação do biureto para a quantificação da proteína.

EXTRATIBILIDADE DAS PROTEÍNAS POR DIVERSOS TIPOS DE SOLVENTES

O Quadro II mostra dados de extratibilidade das proteínas

nas em água destilada usando-se farinha crua de 70 mesh e diferentes relações sólido:líquido (S/L). Quando a relação farinha/água variou de 1:5 para 1:25, a proteína no extrato bruto, determinada pelo método de Kjeldahl ($\% N \times 6,25$), variou de 48,8% da proteína total na farinha a 55,4%. A diálise do extrato bruto em água destilada por 48 horas eliminou, com a água de diálise, cerca de 40% do nitrogênio total extraído. Da fração retida no interior da membrana de diálise, cerca de 2/3 precipitavam durante a diálise "globulinas", enquanto que 1/3 permanecia em solução e constituía as albuminas. A relação globulina/albumina variou nessa série de experimentos entre 2,55, para uma relação sólido:líquido 1:5 e 1,95 para a relação sólido:líquido de 1:25. A diminuição da relação globulina/albumina com o aumento da proporção de água em relação à farinha sugere uma coprecipitação de albuminas com as globulinas durante a diálise, em extratos mais concentrados.

Uma dupla extração da farinha integral, primeiro com água destilada e depois com solução 0,5M de NaCl, usando-se três relações sólido/líquido, a saber: 1:5, 1:10 e 1:20 nas duas extrações, forneceram os dados apresentados no Quadro III. Os dados indicam que pouco mais de 80% da proteína do grão foi extraída por esse processo. A recuperação após a diálise variou entre 74 e 84% da proteína extraída e o quociente globulina/albumina aumentou com a elevação da relação sólido/líquido. Isto era de se esperar devido à mais baixa solubilidade da fração globulina .

A extração fracionada e sequencial do mesmo material, primeiro com água destilada, depois com solução 0,5M de NaCl e, finalmente, com tampão borato de sódio pH 10 contendo 0,5% de mercaptoetanol e 0,5% de lauril sulfato de sódio (LSS), deu uma extração de 93% do nitrogênio total da farinha (% N x 6,25), como indicam os dados do Quadro IV. Desse total 48,0% foi extraído com água destilada, 25,6% com solução 0,5M de NaCl e 19,3% com o tampão borato. Nesse experimento verificou-se que 12,6% das substâncias nitrogenadas da farinha integral era constituída por nitrogênio não protéico (% N x 6,25), solúvel em ácido tricloracético (TCA) na concentração final de 5%. Esse nitrogênio parece estar associado, principalmente, a substâncias inorgânicas e a aminoácidos livres e peptídeos de baixo peso molecular. É interessante o fato de que, se por um lado uma fração nitrogenada do feijão é bastante solúvel (48,0% solúvel em H₂O), outra fração representando 7,0% do nitrogênio total se revelou insolúvel mesmo após três extrações sucessivas, a última delas em condições bastante drásticas, isto é, pH 10 e presença do detergente (LSS) e de agente redutor como mercaptoetanol.

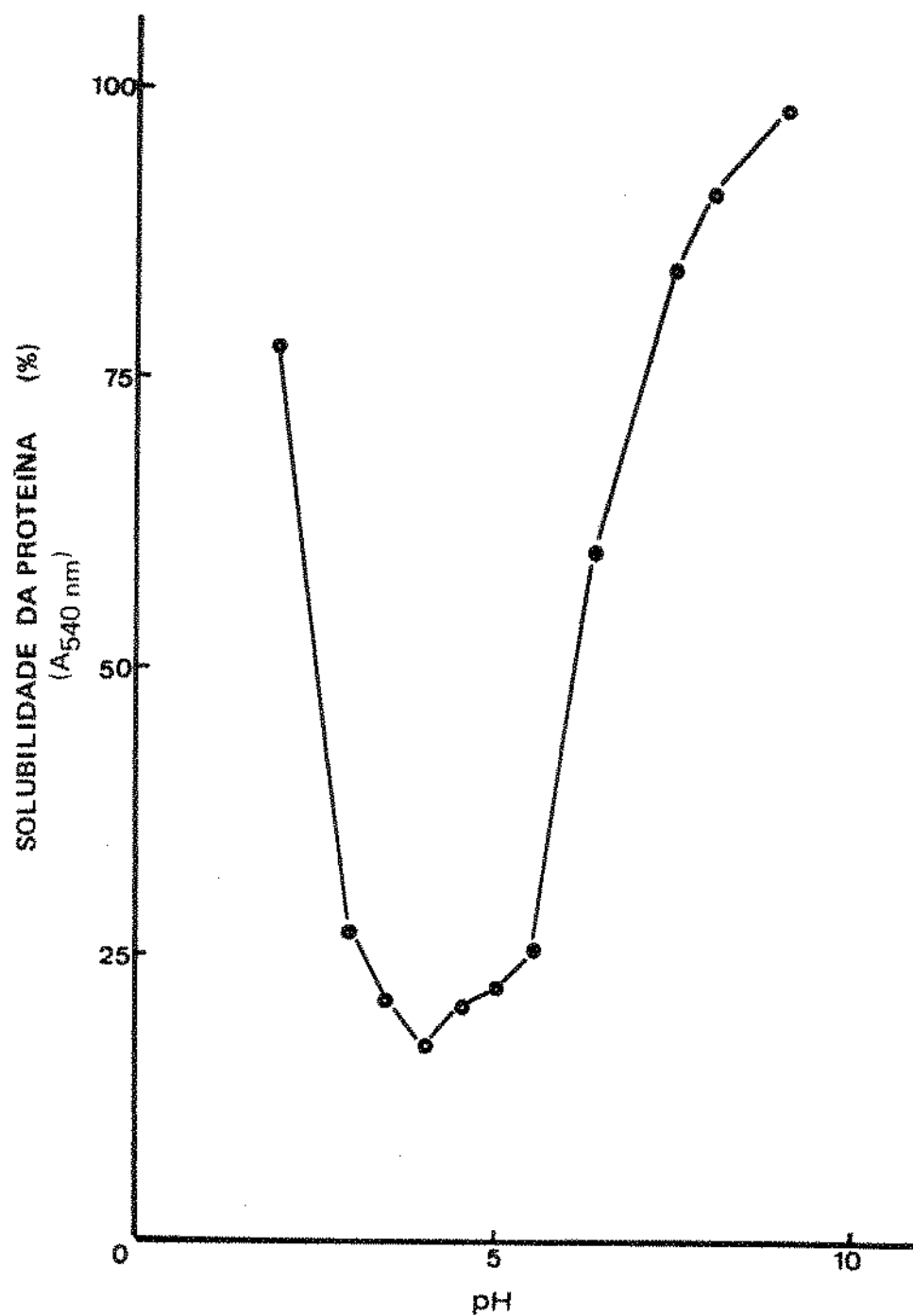


Fig. 3. Curva de extratibilidade das proteínas de feijão (Rosinha G2) em função do pH do solvente, Relação sólido/líquido 1:20.

Quadro II. Extratibilidade das proteínas de feijão em água destilada, usando-se diferentes relações sólido/líquido (S/L).

Relação (S/L)	EB	IPT	F ₂		F ₂ /F ₁
			F ₁	F ₂	
grama proteína extraída (8 N x 6,25)/100g farinha (21,1% proteína)					
1:5	10,30(48,8) ^a	6,40(62,1) ^b	1,80(28,1) ^c	4,60(71,9) ^c	2,55
1:10	10,15(48,1)	6,30(62,0)	1,92(30,5)	4,38(69,5)	2,28
1:15	10,95(51,9)	6,59(60,2)	2,07(31,4)	4,52(68,6)	2,18
1:20	11,25(53,3)	6,60(58,7)	2,24(33,9)	4,36(66,1)	1,94
1:25	11,70(55,4)	6,95(59,4)	2,35(33,8)	4,60(66,2)	1,95

^a proteína total extraída, porcentagem do total na farinha; ^b proteína total recuperada após diálise, porcentagem do total extraído; ^c proteína recuperada nas frações albumina e "globulina", porcentagem do total recuperado após diálise.
EB, extrato bruto; IPT, isolado protéico total; F₁, albumina; F₂, precipitado da diálise "globulina"; F₂/F₁, relação "globulina"/albumina.

Quadro III. Extração dupla das proteínas^a da farinha com 21% de proteína e 9% de umidade. Primeira com água destilada e segunda com solução 0,5M de NaCl.

Determinação	Relação (S/L)		
	1:5	1:10	1:20
Proteína no extrato bruto, EB (g/100g de farinha)	17,28	17,31	17,10
Porcentagem de extração	82,28	82,43	81,43
Proteína total após diálise (g/100g de farinha)	13,46	12,81	14,43
Porcentagem de recuperação após diálise	77,89	74,00	84,38
Albumina recuperada após diálise, F ₁ (g/100g de farinha)	4,54	3,87	4,15
Proteína precipitada na diálise ^b , F ₂ (g/100g de farinha)	8,92	8,94	10,28
Relação (Globulina/Albumina)	1,96	2,31	2,47

^a % N x 6,25

^b Diferença entre proteína total recuperada após diálise e proteína determinada na fração solúvel, F₁.

Quadro IV. Extração fracionada das substâncias nitrogenadas da farinha^a do feijão (% N x 6,25) com diferentes sol_uventes (relação S/L 1:5).

Determinação e procedimento ^b	Substância nitrogenada (g/100g de farinha)	Porcentagem do total na farinha
Dosagem na farinha integral	21,50	100,0
Extração com água destilada	10,34	48,0
Extração do resíduo com NaCl 0,5M	5,50	25,6
Extração do novo resíduo com tampão borato pH 10 contendo 0,5% de mercaptoetanol e 0,5% de lauril sulfato de s _o dio (LSS)	4,14	19,3
Total de substâncias nitroge _n adas extraídas nas três ex _{tr} ações	19,98	92,9
Substâncias nitrogenadas não protéicas (solúveis em sol. TCA 5%)	2,72	12,6

^a Farinha com 8,5% de umidade

^b Extrações feitas em série, utilizando-se em cada nova extra_ção o resíduo insolúvel da extração precedente.

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO TÉRMICO DO GRÃO SOBRE A EXTRATIBILIDADE DAS PROTEÍNAS EM ÁGUA DESTILADA.

Os efeitos do tratamento térmico do grão a 97°C , por vários tempos, sobre a extratibilidade das proteínas da farinha integral produzida a partir destes grãos, são mostrados nos dados do Quadro V, que também mostram a atividade inibidora da tripsina nos homogenados dessas farinhas e no extrato aquoso obtido por filtração dos homogenados.

A extratibilidade das proteínas que foi de 72% na farinha crua caiu para 33,6% na obtida de grãos aquecidos por quatro minutos a 97°C , para 13,4%, depois de 30 minutos de aquecimento e para 9,4% nos grãos que foram aquecidos por 60 minutos. O nitrogênio extraído dos grãos aquecidos por 30 minutos, ou mais, a 97°C , representa basicamente o nitrogênio contido nas substâncias nitrogenadas não protéicas e de baixo peso molecular. É interessante observar que o extrato aquoso de grãos aquecidos por quatro minutos, ou mais, a 97°C , não apresentou nenhuma atividade inibidora sobre a tripsina bovina.

A figura 4 (A) mostra o perfil eletroforético das proteínas do extrato aquoso de grãos com diferentes tempos de aquecimento. O número debaixo de cada perfil indica o tempo de aquecimento a 97°C , em minutos. Pode-se nitidamente observar o desaparecimento das bandas de maior mobilidade eletroforética e o espessamento ou aumento das concentrações das bandas de menor mobilidade eletroforética. Essa mudança do comportamento eletroforético das proteínas, em função do tempo de aquecimento, pode

ria estar indicando alterações estruturais e/ou agregações das mesmas pela ação do calor.

Na figura 4 (B), o primeiro tubo (I) indica a mobilidade relativa dos inibidores de tripsina isolado em coluna de Sephadex. Pode-se também notar o seu desaparecimento dos perfis eletroforéticos com mais de quatro minutos de aquecimento a 97°C.

Quadro V. Efeitos do tratamento térmico a 97°C do grão de feijão^a sobre a extratibilidade das proteínas e sobre a atividade inibidora da tripsina.

Tratamento térmico (min)	Proteína extraída (% do total)	Atividade inibidora da tripsina (UTI/mg Proteína)	
		Extrato aquoso (filtrado)	Homogenado (integral)
0	72,2	78,0	55,0
1	49,9	59,4	48,7
2	43,1	21,0	7,3
3	38,2	5,2	6,0
4	33,6	0,0	0,0
5	30,4	0,0	0,0
10	20,1	0,0	0,0
15	15,3	0,0	0,0
30	13,4	0,0	0,0
60	9,4	0,0	0,0

^a Maceração por 12 horas, tratamento térmico, liofilização, moagem e extração (2g de farinha com 10% de umidade/100 ml de água, agitação por 2 horas).

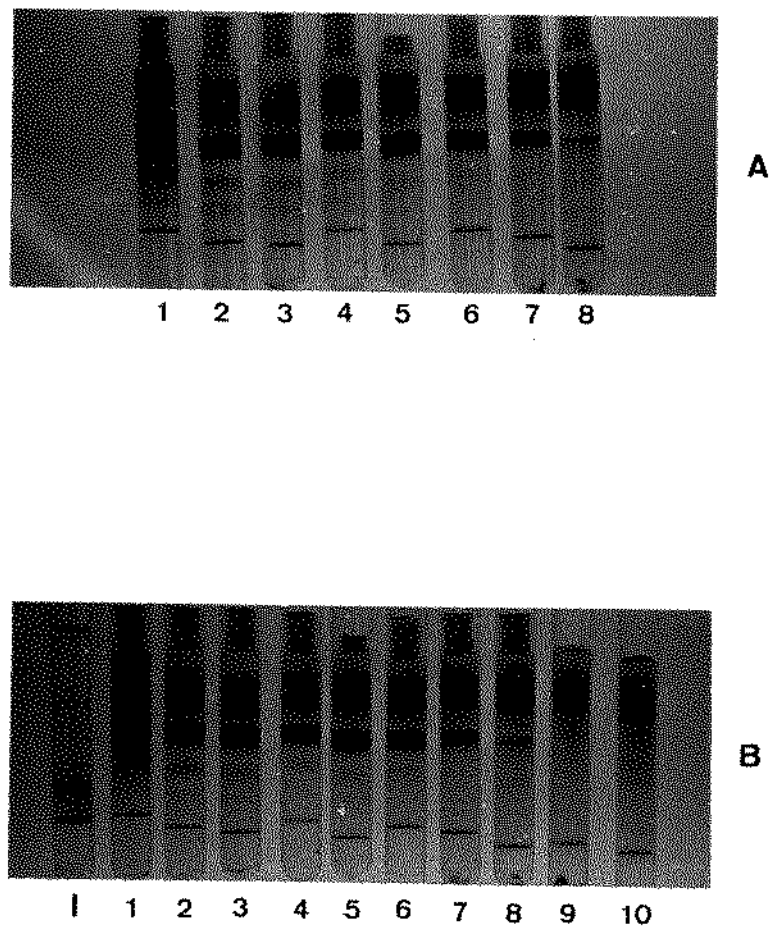


Fig. 4. Efeito do tratamento térmico sobre a extratibilidade das proteínas do grão de feijão (A) e sobre os inibidores de tripsina e de quimotripsina (B). Números 1 a 10 indicam tempo (min) de aquecimento do grão a 97°C; 1, inibidores de tripsina e de quimotripsina.

FRACIONAMENTO E ANÁLISE DAS PROTEÍNAS

As diferenças de solubilidade, de coagulabilidade térmica e de precipitabilidade com sulfato de amônio, permitiram o fracionamento das proteínas extraídas em pelo menos sete frações diferentes, a saber: F₁) fração solúvel em água após a diálise; F₂) fração precipitável pela diálise em água; F₃) fração extraída do precipitado da diálise, com solução 0,5M de NaCl; F₄) resíduo do precipitado da diálise, após re-extração com solução 0,5M de NaCl; F₅) albumina não coagulável pelo aquecimento a 97°C por 15 min; F₆) albumina coagulável pelo aquecimento a 97°C durante 15 min; e F₇) albumina não coagulável precipitada com sulfato de amônio a 65% de saturação.

Os principais constituintes dessas frações são proteínas e carboidratos, como mostram os dados analíticos do Quadro VI.

O extrato bruto da farinha de feijão integral contém pigmentos que podem se ligar às proteínas. Assim, o isolado protéico total (IPT) e a fração que precipitava durante a diálise eram pigmentadas, apresentando uma coloração marron clara ou âmbar. Quando a fração precipitada durante a diálise era re-extraída com solução 0,5M de NaCl, em seguida dialisada em água destilada e liofilizada, obtinha-se um material branco, completamente despigmentado que continha, principalmente, as globulinas. O resíduo, insolúvel em solução 0,5M de NaCl, era fortemente pigmentado, apresentando uma coloração marron escura, seme

A fração solúvel em água, após a diálise, continha as albuminas e uma elevada porcentagem de carboidrato. Esse material era quase branco, às vezes, de uma coloração amarelo-pálida. Mais de 2/3 das albuminas são coaguláveis pelo calor e precipitavam pelo aquecimento da solução a 97°C durante 15 minutos. Essa fração, quando seca, apresentava uma coloração levemente amarelada.

A maior parte das albuminas que permaneciam em solução, após aquecimento (não coaguláveis), eram precipitáveis pelo sulfato de amônio em uma faixa de saturação entre 45-85%. No Quadro VI aparecem as concentrações de proteína e de carboidrato da fração que precipitou com sulfato de amônio, 0,65 de saturação, e que continha cerca de 85% das albuminas não coaguláveis.

A composição em aminoácidos dessas frações protéicas aparece no Quadro VII. Não se verificam diferenças muito marcantes na composição de aminoácidos dessas frações. Contudo, algumas diferenças poderão ser apontadas. O isolado total e as frações oriundas do material que precipitava durante a diálise possuíam, em geral, alto teor de lisina, arginina, serina, ácido aspártico, ácido glutâmico, valina, leucina e fenilalanina. As proteínas das frações albumina e da precipitada com sulfato de amônio a partir da albumina, continha um teor bem mais elevado de triptofânio e metionina. A fração precipitada com sulfato de amônio, 0,65 de saturação, era particularmente rica em treonina, serina e 1/2 cistina.

A composição em aminoácidos da farinha integral, do resíduo insolúvel após duas extrações da farinha, a primeira

com água destilada e a segunda com solução 0,5M de NaCl, e, a dos sólidos dialisáveis, aparece no Quadro VIII.

A composição das proteínas da farinha integral e do resíduo insolúvel era muito semelhante, destacando-se o elevado teor de lisina e as concentrações bastante baixas de metionina e cistina. Quanto à fração representada pelos sólidos dialisáveis pode-se verificar uma grande variação na concentração dos diferentes aminoácidos, destacando-se a elevada concentração de ácido glutâmico, ácido aspártico e arginina. Embora a hidrólise ácida tenha revelado baixa concentração de metionina nessa fração, a determinação colorimétrica pelo método de Lunder (1973) deu um teor bastante significativo de 3,12 g/16g N para a metionina.

Como se pode observar no Quadro VI, as diversas frações protéicas isoladas, estavam associadas com proporções variáveis de carboidrato. Como essas frações tinham sido, todas elas, submetidas à diálise prolongada (36-72h), supos-se que todo carboidrato, ainda presente no material, estaria ou ligado à molécula protéica por ligações covalentes (glicoproteína) ou na forma de polissacarídeo, livre ou associado às moléculas por ligações não covalentes.

A fração albumina é a que apresentou a maior concentração de carboidrato, 27,7%. Essa fração contém proteínas tóxicas e antinutricionais, algumas das quais são reconhecidamente glicoproteínas, como as fito-hemaglutininas. Os inibidores de tripsina e de quimotripsina, também presentes nessa fração,

são tidos como proteínas que não contêm carboidrato na molécula.

A identificação dos açúcares (monossacarídeos) presentes na fração albumina foi feita, após a hidrólise ácida, por cromatografia em papel e em fase líquido-gasosa. A cromatografia em papel sugeriu a existência de galactose, glicose, manose, arabinose e xilose no hidrolisado da fração albumina. A presença desses açúcares foi comprovada pela cromatografia líquido/gasosa dos trimetilsilil derivados (TMS) como mostra a figura 5. A identificação dos monossacarídeos provenientes da amostra foi feita, comparando suas retenções na coluna com as dos derivados obtidos a partir de amostras padrões. Os açúcares utilizados como padrões produziram, alguns deles, mais de um pico no cromatograma devido à formação de derivados das formas α e β (anômeros) e também devido à possibilidade da existência de estruturas piranosídicas e furanosídicas para a mesma substância.

As proteínas da fração albumina foram precipitadas com ácido tricloracético (TCA) a uma concentração final de 5% (P/V), seguido de lavagens com solução a 5% de TCA, com éter dietílico (2 vezes) e com etanol, nessa ordem. Esse material, depois de seco, continha 87,5% de proteína e 7,75% de carboidrato total expresso como manose. Esses dados indicaram que uma grande parte do carboidrato da fração albumina original (cerca de 75% do total) permanecia solúvel em TCA, após a precipitação da proteína, e apenas cerca de 25% aparecia na fração protéica precipitada pelo TCA. É possível que o carboidrato que co-precipitava com a proteína esteja ligado à mesma por ligações covalentes,

enquanto que a fração carboidrática que permanecia em solução no TCA seja representada por polissacarídeos livres ou associados às proteínas por ligações fracas, não covalentes.

A análise cromatográfica dos açúcares neutros (derivados sililados), obtidos a partir de um hidrolisado ácido das albuminas precipitadas com TCA, indicou a presença de xilose, manose, galactose e glicose associadas às proteínas.

A presença de glicosamina na proteína foi evidenciada nos aminogramas obtidos no analisador de aminoácidos a partir de hidrolisados ácidos preparados para a cromatografia. A glicosamina aparecia como um pequeno pico entre leucina e tirosina.

Quadro VI. Porcentagens de proteína e de carboidrato total nas diversas frações protéicas isoladas do feijão Rosinha G2. Duas extrações, uma com água e outra com solução 0,5M de NaCl (relação S/L 1:5). Os dois extratos foram combinados.

Fração protéica	Proteína ^(a) (% N x 6,25)	Carboidrato ^(a) (% manose)
Isolado protéico total (IPT)	65,20	25,05
Fração solúvel em água (albu <u>mina</u>) após diálise (F ₁)	68,40	27,7
Fração precipitável pela diá <u>lise</u> (F ₂)	90,04	8,15
Fração extraída do precipita <u>do</u> da diálise com solução 0,5M de NaCl (F ₃)	92,15	3,47
Resíduo da extração do preci <u>pitado</u> com solução 0,5M de NaCl (F ₄)	93,57	4,95
Albumina coagulável pelo aque <u>cimento</u> a 97°C, 15 min (F ₆)	87,50	7,75
Precipitado de albumina não coagulável com sulfato de amô <u>nio</u> 0,65 de saturação (F ₇)	90,30	6,20

^a Resultados expressos em base seca.

LEGENDA DO QUADRO VII

IPT, isolado protéico total; F₁, albumina; F₂, precipitado da diálise; F₃, re-extraída do precipitado da diálise, com solução 0,5M de NaCl; F₄, resíduo do precipitado da diálise após re-extração com solução 0,5M de NaCl; F₅, albumina não coagulável pelo aquecimento a 97°C, 15 min; F₆, albumina coagulável pelo aquecimento a 97°C, 15 min; F₇, precipitado da albumina não coagulável com (NH₄)₂SO₄, 0,65 de saturação.

Quadro VII. Composição em aminoácidos das diversas frações protéicas isoladas do feijão
(g/16g N)

Aminoácido	IPT	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇
Lis	8,77	5,11	8,07	8,22	8,36	10,05	7,59	5,55
His	3,09	1,32	2,78	2,90	2,69	2,82	1,84	3,02
Arg	6,87	2,51	4,90	5,77	5,19	3,71	4,60	4,16
Asp	17,18	11,91	16,33	19,52	13,37	11,69	21,11	14,96
Tre	6,10	5,52	4,50	4,99	4,83	6,05	10,10	8,04
Ser	8,84	6,33	8,08	9,72	6,63	5,81	11,85	9,41
Glu	18,22	10,44	22,73	22,00	18,34	19,53	14,86	11,43
Pro	4,23	2,70	3,93	4,50	4,81	3,34	4,90	4,42
Gli	5,03	3,27	4,16	4,35	4,55	3,67	5,26	4,28
Ala	5,53	3,82	6,02	4,41	5,56	5,09	5,98	4,59
1/2 Cis	t	0,31	t	t	1,04	2,77	t	3,90
Val	6,23	3,92	5,03	5,68	5,74	2,65	8,07	2,56
Met	1,13	0,50	0,98	0,83	1,57	0,81	0,76	0,78
Ile	4,91	2,99	4,52	5,10	4,58	2,33	5,82	3,71
Leu	10,94	5,50	10,72	12,39	9,55	3,32	12,73	3,12
Tir	4,84	2,23	3,78	4,23	3,97	2,63	4,81	2,57
Fen	7,14	3,58	6,39	8,00	5,67	2,63	8,58	2,57
Trp (a)	1,89	3,12	1,70	1,60	2,28	0,65	4,71	0,93
Met (b)	1,31	1,71	1,00	1,04	1,55	1,29	2,30	1,45

a Método calorimétrico de Spies, 1967; b Método calorimétrico de Lunder, 1973.

Quadro VIII. Composição em aminoácidos da farinha integral do feijão Rosinha G2, do resíduo insolúvel após extrações com água e com solução 0,5M de NaCl e da fração constituída pelos sólidos dialisáveis (g/16gN)

Aminoácido	Farinha integral	Resíduo insolúvel	Sólidos dialisáveis
Lisina	8,77	9,51	1,13
Histidina	2,27	3,45	1,36
Arginina	4,97	7,13	6,91
Ácido aspártico	13,80	12,91	9,82
Treonina	4,70	5,67	1,00
Serina	6,63	7,10	1,01
Ácido glutâmico	20,74	16,38	36,95
Prolina	4,05	4,84	n.i.
Glicina	4,40	6,12	1,09
Alanina	4,81	5,75	1,41
Meia cistina	0,76	t	t
Valina	5,57	5,87	1,09
Metionina	1,31	0,82	0,39
Isoleucina	4,75	4,19	0,39
Leucina	9,94	9,86	1,44
Tirosina	2,47	3,44	0,68
Fenilalanina	5,52	5,78	0,71
Triptofânio ^a	1,03	1,08	0,38
Metionina ^b	1,31	1,23	3,12

^a Método calorimétrico de Spies, 1967.

^b Método calorimétrico de Lunder, 1973.

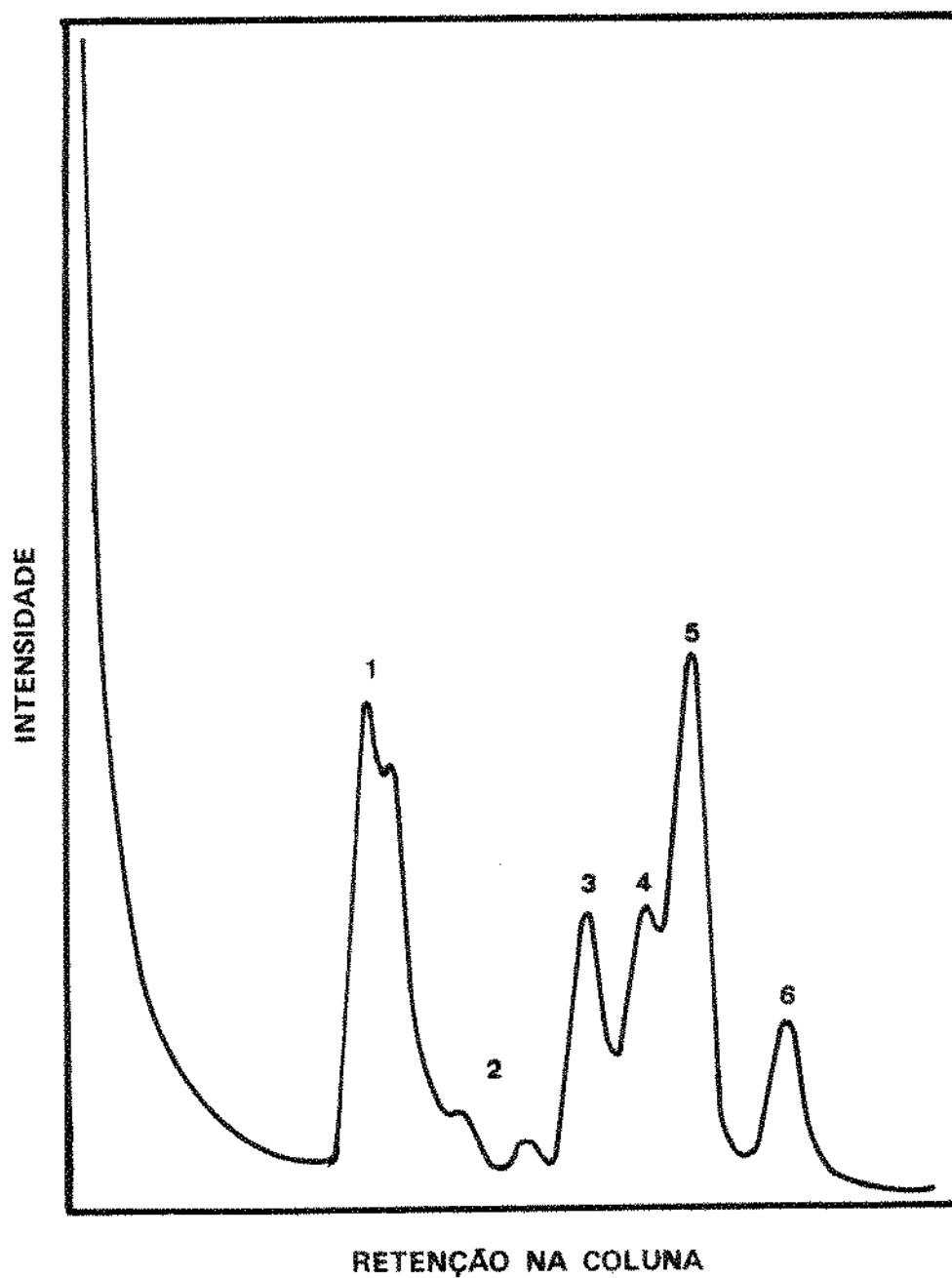


Fig. 5. Perfil cromatográfico dos trimetilsilil derivados dos açúcares neutros, isolados de um hidrolisado da fração albumina (F_1): 1. arabinose; 2. xilose; 3. manose; 4. galactose; 5. glicose, galactose, manose; 6. glicose. Gás de arraste, N_2 (45 ml/min); fase estacionária, Apiezon L (10%) em chromosorb W, programação (temperatura 150 a 200°C, 4°C/min). Injetor 150°C, Detetor 270°C.

CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA DAS PROTEÍNAS NAS PRINCIPAIS FRAÇÕES PROTÉICAS

A figura 6 mostra os perfis eletroforéticos em gel de poliacrilamida simples das principais frações protéicas extraídas do feijão Rosinha G2.

O perfil F_1 é o das albuminas, isto é, das proteínas que permaneciam solúveis em água após diálise do extrato salino (0,5M NaCl). A mobilidade eletroforética dessas proteínas variou de 0,12 a 0,93 em relação ao corante azul de bromofenol usado como referência. As proteínas de mais alta concentração deram as bandas de mobilidade 0,39; 0,46 e 0,67. As fito-hemaglutininas dessa fração estavam contidas nas bandas com mobilidades relativas 0,39 e 0,46, neste gel.

As bandas do perfil F_2 representam as proteínas do precipitado que se formou durante a diálise em água destilada, de um extrato salino (0,5M NaCl). Várias proteínas dessa fração apresentaram mobilidade eletroforética coincidindo com as da fração albumina. Isto se deve, em parte, à co-precipitação de albuminas com o precipitado da diálise e também devido ao fato de que algumas globulinas são parcialmente solúveis em água e não precipitam totalmente durante a diálise.

O perfil F_3 , mostra as proteínas do precipitado da diálise que são, portanto, insolúveis em água e solúveis em solução 0,5M de NaCl. Antes dessa eletroforese o precipitado foi re-extraído com solução 0,5M de NaCl, dialisado novamente em água destilada e, em seguida, liofilizado. Pode-se verificar

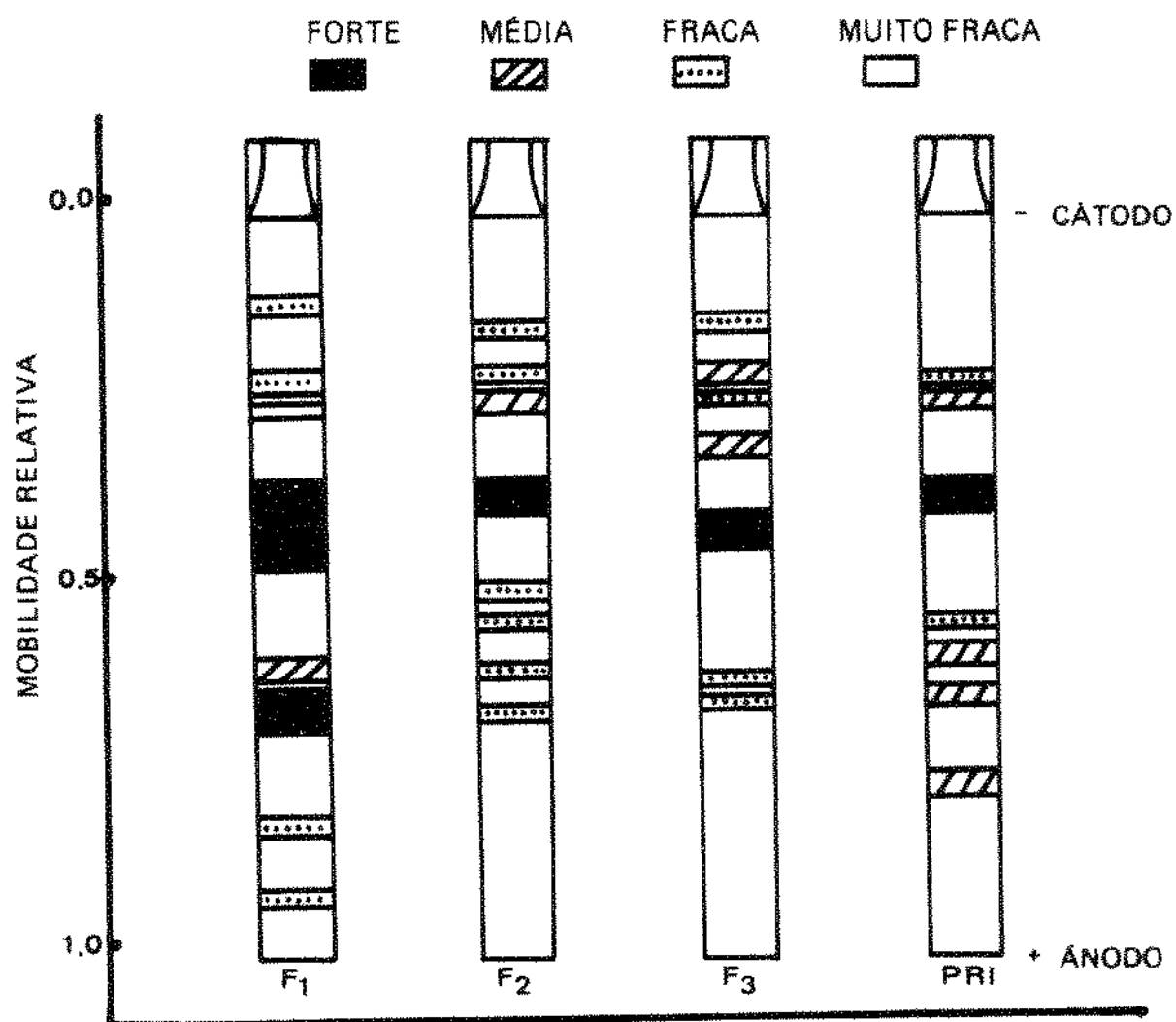


Fig. 6. Perfis eletroforéticos de algumas frações protéicas obtidas do feijão Rosinha G2. F₁, albuminas; F₂, fração precipitada de um extrato salino durante a diálise em água destilada; F₃, proteínas extraídas do precipitado da diálise com solução 0,5M de NaCl (globulinas); PRI, proteínas do resíduo insolúvel em água mais NaCl, extraídas em solução aquosa a pH 9,0.

que várias proteínas dessa fração apresentavam a mesma mobilidade eletroforética que alguns dos componentes da fração albumina.

Finalmente, o perfil PRI representa as proteínas extraídas do resíduo insolúvel resultante de duas extrações sucessivas da farinha, a primeira com água e a segunda com solução 0,5M de NaCl. Para essa eletroforese, o resíduo insolúvel foi re-extraído com água a pH 9,0. Foram extraídas sete proteínas, algumas das quais coincidiram em mobilidade com as globulinas e outras com as albuminas.

PODER DE HIDRÓLISE DA PEPSINA E DA PNACREATINA SOBRE AS PROTEÍNAS DE DIFERENTES FRAÇÕES PROTÉICAS

O poder de hidrólise (proteólise) da pepsina e da pancreatina sobre as proteínas da farinha integral, de diferentes frações protéicas isoladas da farinha, e das proteínas que permaneceram no resíduo insolúvel, após extrações sucessivas com água, solução de cloreto de sódio, e de hidróxido de sódio, é mostrado no Quadro IX. Os dados mostram também o efeito do aquecimento da proteína a 97°C sobre o poder de hidrólise dessas enzimas proteolíticas.

Nessa série de experimentos a proteólise pela pepsina mais pancreatina foi testada no material sem nenhum tratamento térmico (cru) e aquecido por 5, 10, 15, 30 e 60 minutos em água em ebulição (97°C). Para o aquecimento, o material foi dissolvido ou suspenso em água destilada na concentração de 1% (P/V).

As constatações mais interessantes dessas experiências

foram o baixo valor de proteólise encontrado para as proteínas da farinha integral, para a albumina integral e para a fração albumínica não coagulável pelo aquecimento a 97°C, durante 15 minutos.

Na farinha integral, crua, a proteólise foi de 27,4% e se elevou gradativamente para 43,7%, após 60 minutos de aquecimento a 97°C. Na fração albumina total a proteólise, antes de qualquer aquecimento, foi de 46,0% elevando-se, ligeiramente, para 47,7% com 10 minutos de aquecimento, para então decrescer a 39,2%, depois de 60 minutos.

Por outro lado, foi surpreendente a constatação de que as proteínas precipitadas durante a diálise "globulinas" apresentassem uma proteólise bem mais elevada, que variou entre 60,5% no material sem nenhum tratamento térmico a 71,3% na amostra aquecida por 60 minutos a 97°C. Ainda mais interessante foi que a re-extração do precipitado da diálise com solução 0,5M de NaCl, forneceu uma fração protéica (globulina) bem mais hidrolizável pelas proteases que as demais frações. A proteólise nessa fração foi de 68,6%, sem nenhum tratamento térmico, passando a 89% com 15 minutos de aquecimento e decrescendo ligeiramente para 86,2%, após 60 minutos.

Uma parte do precipitado formado durante a diálise se mostrou insolúvel em solução 0,5M de NaCl. Essa fração, que se apresentava fortemente pigmentada, deu valores de proteólise em torno de 77%, tanto nas amostras não tratadas termicamente como nas que receberam aquecimento por tempos diferentes.

O baixo poder de proteólise da pepsina e da pancreatina sobre as proteínas da farinha integral foi atribuída a vários fatores, dentre eles a incompleta inativação dos inibidores de tripsina e de quimotripsina e a possível complexação das proteínas com outros constituintes da farinha, nas condições dos experimentos.

No caso das frações albumina total e albumina não coagulada (97°C, 15 min), o baixo poder de hidrólise da pepsina e da pancreatina, provavelmente, foi ainda devido à falta de inativação dos inibidores de tripsina e de quimotripsina e à estrutura desfavorável dessas proteínas.

O baixo poder hidrolítico da pepsina e da pancreatina sobre as proteínas que permaneceram no resíduo insolúvel, após extração e re-extrações da farinha, poderia ser atribuído ou à natureza estrutural mais complexa dessas proteínas ou, o que é mais provável, ao estado de complexação das proteínas com outros constituintes das sementes e, portanto, da farinha.

Os efeitos de diferentes tratamentos químicos das frações albumina e globulina sobre o poder de hidrólise pela pepsina e pela pancreatina são mostrados no Quadro X.

A ação hidrolítica da pepsina e da pancreatina sobre a fração albumina variou bastante em função do tratamento. Em primeiro lugar podemos destacar o efeito do pH sobre a facilidade de hidrólise dessas proteínas. Pode-se verificar um aumento da proteólise com a elevação do pH da solução. Na proteína aquecida em água a pH 1,8 a proteólise foi de 60,94%, enquanto que, na

aquecida em pH 9,5 foi de 75,11%.

Um tipo de reação que exerceu influência decisiva na proteólise das albuminas pela pepsina mais pancreatina, foi a de rompimento das pontes dissulfídicas por redução ou pela sulfitólise. O aquecimento da albumina em solução 30mM de ditio treitol (DTT) elevou a proteólise para 76,87% e a sulfitólise a pH 9,0 para 79,34%.

A presença de uréia na solução, durante o aquecimento diminuiu consideravelmente a porcentagem de hidrólise enzimática das albuminas, que caiu para 50% em solução 8M de uréia. Essa diminuição foi, contudo, atribuída mais a uma alteração da estrutura das proteínas, tornando-as mais solúveis em solução de TCA, do que no sentido de ter ocorrido uma diminuição da capacidade de hidrólise enzimática. O fenômeno foi assim interpretado por ter havido um aumento muito grande na leitura do branco (nitrogênio solúvel em TCA) das amostras aquecidas em presença de uréia.

No caso da fração globulina, o aquecimento em pH's diferentes e na presença de fosfato de sódio não afetou, praticamente, a porcentagem de proteólise. Porém, o aquecimento em presença de uréia e, particularmente, em presença de DTT, elevou consideravelmente a proteólise que atingiu 93,76%.

Quadro IX. Poder de hidrólise (%) da pepsina e da pancreatina sobre as proteínas da farinha integral, das frações proteicas isoladas e das proteínas dos resíduos insolúveis; sem tratamento térmico, e aquecidas a 97°C por tempos variáveis entre 5 e 60 minutos em suspensão aquosa a 1% de sólidos.

Amostras	Sem aquecimento (crua)	Aquecimento a 97°C (min)				
		5	10	15	30	60
FI	27,4	32,3	35,6	36,8	39,0	43,7
IPT	51,9	56,7	56,4	59,0	59,4	58,9
F ₁	46,0	46,4	47,7	47,1	42,5	39,2
F ₂	60,5	63,5	63,8	64,0	65,8	71,3
F ₃	68,6	83,4	88,7	88,9	86,6	86,2
F ₄	76,9	77,0	77,0	77,0	77,2	76,8
F ₅				30,4	33,9	34,2
F ₆				59,2	59,7	62,3
PRI ₁	47,9	49,8	50,2	51,5	51,9	52,9
PRI ₂	40,7	41,8	41,9	42,1	42,3	42,3

FI, farinha integral; IPT, isolado protéico total; F₁, albuminas; F₂, precipitado da diálise; F₃, extraída do precipitado da diálise com solução 0,5M de NaCl; F₄, resíduo do precipitado da diálise insolúvel em solução 0,5M de NaCl; F₅, albumina não coagulada; F₆, albumina coagulada; PRI₁, proteína do resíduo insolúvel (H₂O, NaCl 0,5M e H₂O pH 9); PRI₂, proteína do resíduo insolúvel (H₂O, NaCl 0,5M e NaOH 0,2M).

Quadro X. Efeito de diferentes tratamentos químicos das frações albumina e globulina sobre o poder hidrolítico da pepsina e da pancreatina.

Tratamento (97°C, 30 min)	Proteólise (%)	
	Albumina ^a	Globulina ^a
Água pH 1,8	60,94	79,02
Água pH 9,5	75,11	78,57
Fosfato de sódio pH 7,0	67,09	71,46
Sulfitólise pH 9,0	79,34	81,71
Solução de uréia 8M	50,00	88,44
Solução de uréia 4M + ditiotreitól 15mM	55,28	86,96
Solução de ditiotreitól 30mM	76,87	93,76

^a Albumina e globulina dissolvidas na concentração de 1% (P/V), aquecidas por 30 minutos, dialisadas exaustivamente para eliminar os reagentes e liofilizadas.

ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS INIBIDORES DE TRIPSINA E DE QUIMO TRIPSINA.

O isolamento e a purificação dos inibidores da tripsina e da quimotripsina, a partir de um extrato bruto da farinha de feijão integral, foram feitos utilizando-se das técnicas de diálise, de ultrafiltração em colunas de Sephadex, da cromatografia em DEAE-celulose e das diferenças encontradas na resistência térmica (coagulabilidade) e de precipitação com sulfato de amônio.

O fracionamento obtido pela ultrafiltração de um extrato bruto, em colunas de Sephadex G-100 aparece na figura 7. Esse extrato foi obtido a partir de duas extrações da farinha, a primeira com água e a segunda com solução 0,5M de NaCl, mantendo-se a relação sólido/líquido de 1:5 (P/V) e misturando-se os extratos no final. Esse procedimento permitiu a separação das proteínas do extrato bruto em, pelo menos, sete frações proteicas. As proteínas contidas no pico com atividade inibidora representavam 4 a 6% da proteína total, estimada pela absorbância total dos picos a 280 nm. Após diálise e liofilização, esse material se mostrou ligeiramente pigmentado, separando-se em três a quatro bandas de proteína pela eletroforese em gel de poliacrilamida. As duas bandas de maior mobilidade eletroforética apresentavam atividade inibidora, tanto da tripsina, como da quimotripsina.

A atividade inibidora específica contra a tripsina e a quimotripsina, determinada no isolado protéico total, nas fraç

ções albumina e globulina e no material ativo isolado da coluna de Sephadex G-100, bem como o grau de purificação obtido para o inibidor pela filtração no gel, são dados no Quadro XI. A purificação de 33 vezes, obtida para o inibidor; com uma única passagem do extrato bruto através da coluna de Sephadex G-100, foi surpreendente. Apesar de eficiente e interessante, esse procedimento não foi continuado devido à sua morosidade e à pequena quantidade recuperada em cada coluna, além do que, o material isolado apresentava-se pigmentado.

O isolamento de maior quantidade de inibidores, parcialmente purificados e com elevada atividade inibidora contra a tripsina e a quimotripsina, só foi possível após a descoberta de que os inibidores eram termo-resistentes, mantendo suas atividades inalteradas após aquecimento da solução de albumina a 97°C por 15, 30 e até 60 minutos. O aquecimento das albuminas, em água destilada por 15 min a 97°C, provocava a coagulação da maior parte das proteínas sem afetar os inibidores, que permaneciam ativos e em solução.

Observou-se, ao longo das investigações, que a fração albumina era a que continha sempre a mais alta atividade inibidora sobre a tripsina e a quimotripsina. Por esse motivo decidiu-se tomar essa fração como ponto de partida para o isolamento e a purificação dos inibidores, adotando-se o tratamento térmico da solução de albumina (97°C, 15 min) como primeira etapa da purificação. Com esse tratamento precipitava-se (coagulação) cerca de 70% das albuminas, deixando em solução (fração não coa

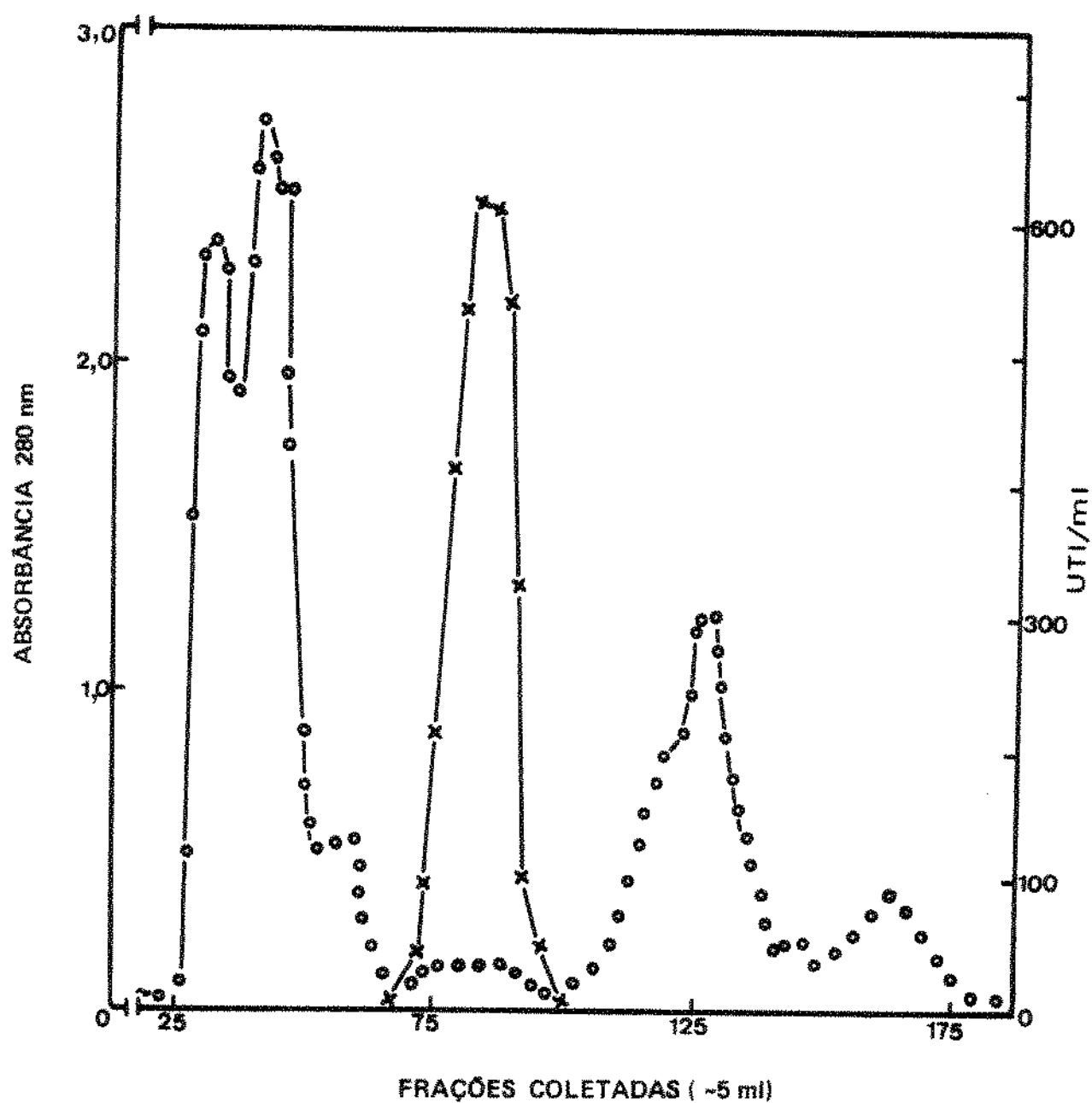


Fig. 7. Ultrafiltração em gel de Sephadex G-100 (coluna 2,5 x 90 cm) de um extrato bruto (água, NaCl 0,5M) de feijão Rosinha G2. Gel equilibrado em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,6; eluição com o mesmo tampão (50 ml/h). Proteína, o—o—o; atividade inibidora da tripsina, x—x—x.

Quadro XI. Atividade específica e grau de purificação dos inibidores de tripsina e de quimo tripsina em diferentes frações protéicas extraídas do feijão Rosinha G2.

Fração protéica	Proteína (%)	Atividade específica do inibidor		Grau de purificação (nº vezes)	
		UTI/mg proteína	UQTI/mg proteína	Tripsina	Quimotripsina
Isolado protéico total (IPT)	61,9	110,1	32,9		
Albumina (F ₁)	62,6	417,3	108,2	3,80	3,29
Globulina (F ₃)	86,6	26,8	15,0	0,24	0,45
Inibidores isolados do extrato bruto (Sephadex G-100)	68,0	3648,0	420,00	33,13	12,76

UTI = unidades de tripsina inibidas
UQTI = unidades de quimotripsina inibidas

gulável) toda a atividade inibidora da tripsina e da quimotripsina.

O tratamento da fração não coagulável com sulfato de amônio, 0,65 de saturação, precipitava cerca de 85% da proteína total dessa fração e mais de 90% da atividade inibidora. Esse precipitado, quando analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida, apresentava quatro a cinco bandas de proteína. As duas bandas de maiores mobilidades na eletroforese, isto é, 0,70 a 0,75 e 0,76 a 0,83, em relação ao azul de bromofenol, apresentavam atividade inibidora tanto da tripsina como da quimotripsina.

A ultrafiltração da fração contendo as albuminas não coaguláveis, em colunas de Sephadex G-100, resultou no perfil da figura 8. Nesse perfil vêem-se dois picos de proteína, apenas um deles com atividade inibidora.

Melhor resolução do pico com atividade inibidora obteve-se pela ultrafiltração do precipitado com sulfato de amônio, 0,65 de saturação, em coluna de Sephadex G-50, como mostra a figura 9. Os inibidores (IG-50) isolados por esse processo separavam-se na eletroforese de poliacrilamida em duas bandas de proteína, uma fraca e outra forte, ambas com atividade inibidora sobre as enzimas tripsina e quimotripsina.

A recromatografia do material ativo isolado da coluna de Sephadex G-50 (IG-50) em uma coluna do mesmo gel, porém mais longa e de menor diâmetro (120 x 1 cm), forneceu na eluição um único pico, figura 10.

Uma tentativa de separação das duas proteínas que compõem o IG-50 foi feita em uma coluna de troca iônica (2,5 x 50 cm) de DEAE-celulose. O perfil de separação é mostrado na figura 11, onde são vistos dois picos (P_1 e P_2), ambos com atividade inibidora, tanto para tripsina como para quimotripsina. A eletroforese em gel de poliacrilamida revelou a presença das mesmas duas bandas tanto em P_1 como em P_2 . A banda de maior mobilidade na eletroforese (B_1) corresponde ao pico P_2 e a de menor mobilidade (B_2) corresponde ao pico P_1 .

No Quadro XII, são dadas as atividades específicas, os graus de purificação (número de vezes) e as porcentagens de recuperação dos inibidores, ao longo do processo finalmente adotado para seu isolamento e purificação. O material eluído da coluna de Sephadex G-50 a partir do precipitado com sulfato de amônio, 0,65 de saturação, revelou um grau de purificação de 31 vezes e uma porcentagem de recuperação de 59,5% em relação ao extrato bruto.

A atividade inibidora nas diversas frações protéicas, obtidas ao longo do processo de purificação é dada no Quadro XIII, em unidades de tripsina e de quimotripsina inibidas, por miligrama de amostra e por miligrama de proteína.

É importante notar as atividades específicas bastante elevadas dos inibidores de tripsina e de quimotripsina nas frações precipitadas com sulfato de amônio, após eluição da coluna de Sephadex G-50.

Por outro lado, foi surpreendente a atividade específi

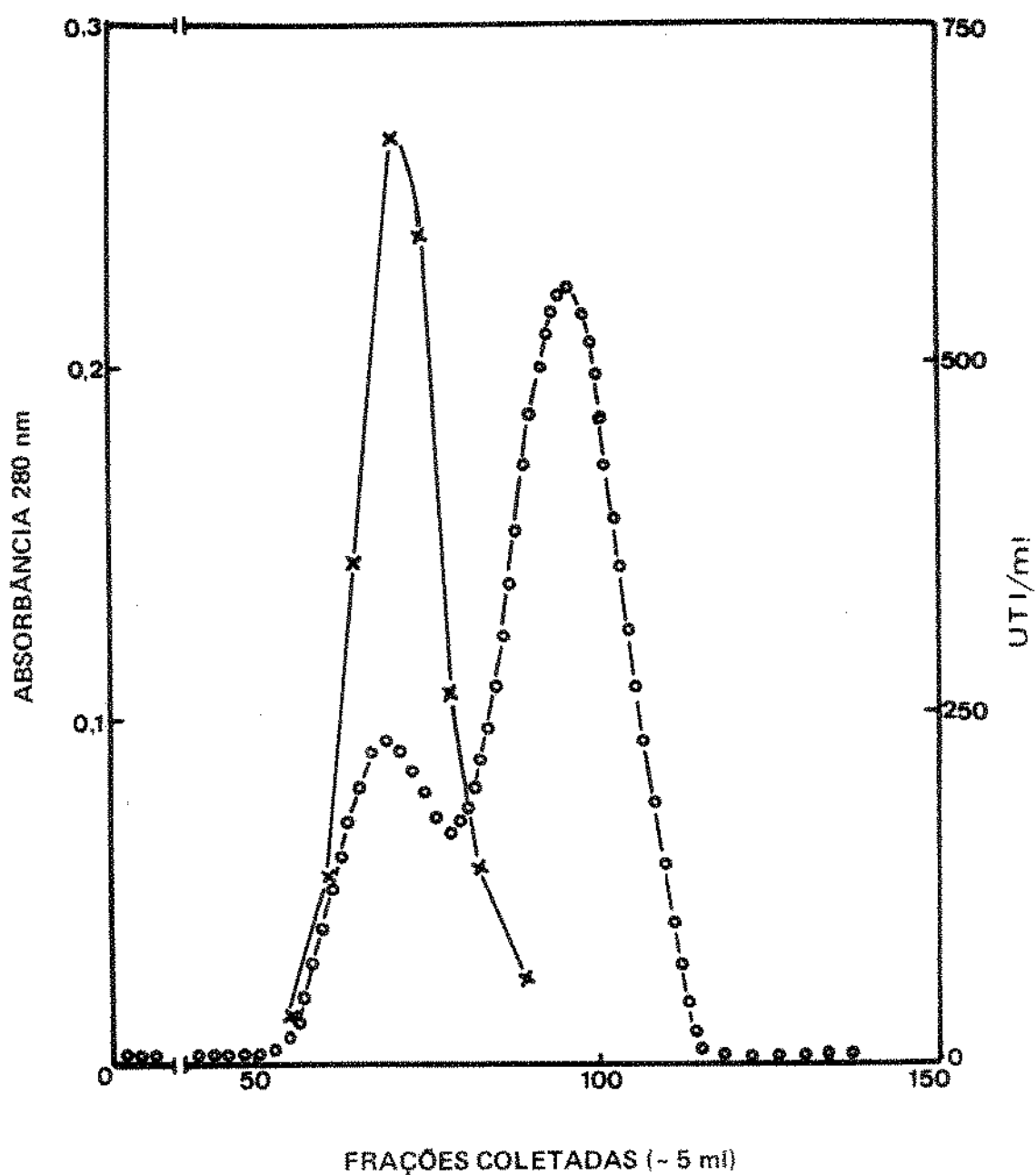


Fig. 8. Ultrafiltração em gel de Sephadex G-100 (coluna 2,5 x 90 cm) da fração albumina previamente aquecida a 97°C, 15 minutos. Gel equilibrado em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,6; eluição com o mesmo tampão (50 ml/h). Proteína, o—o—o; atividade inibidora da tripsina, x—x—x.

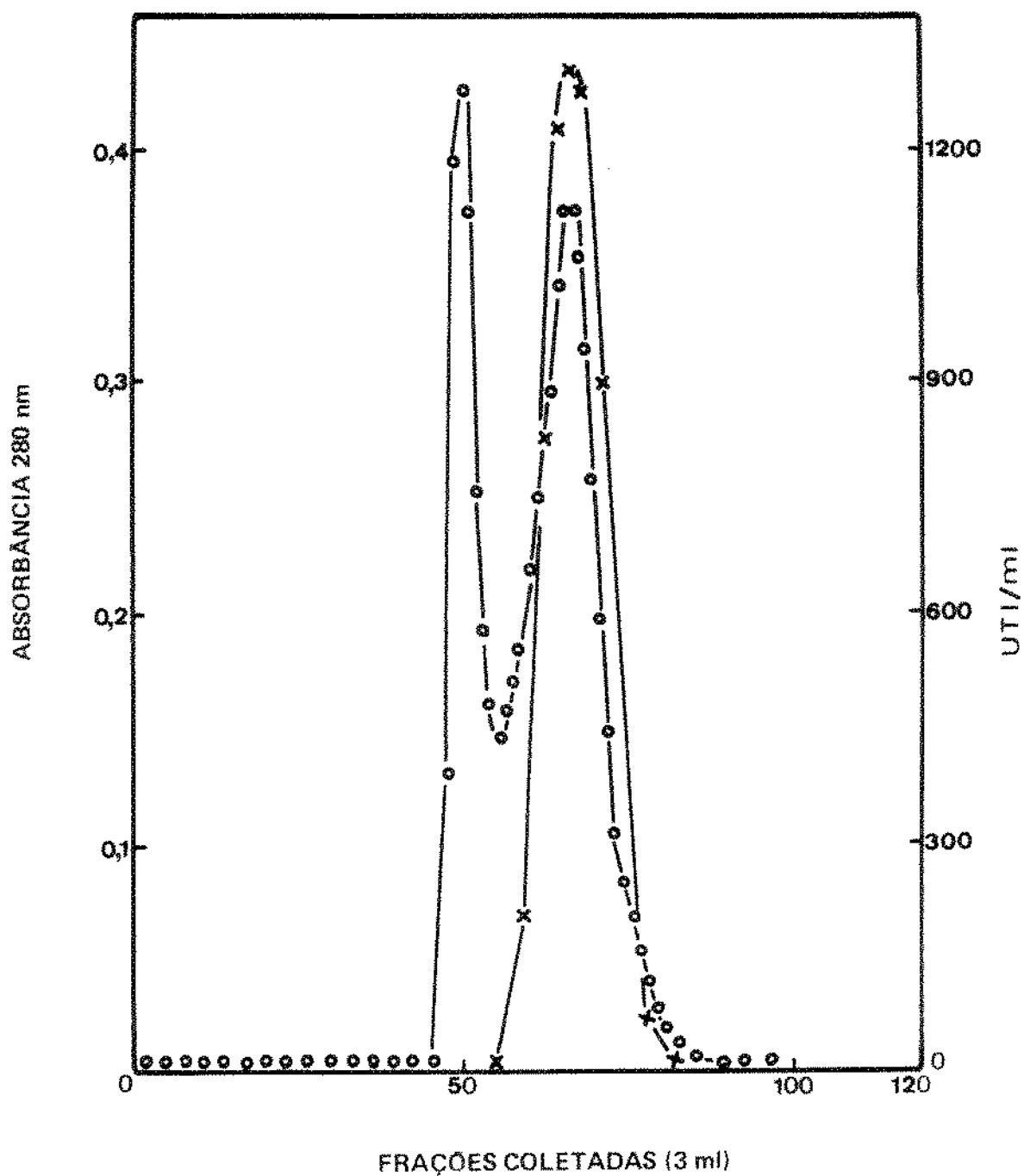


Fig. 9. Ultrafiltração em gel de Sephadex G-50 (coluna 2,5 x 90 cm) do material precipitado com sulfato de amônio (0,65 de saturação) a partir da fração albumina não coagulável pelo aquecimento por 15 min a 97°C. Gel equilibrado com fosfato de sódio tampão 0,01 M, pH 7,6; eluição com o mesmo tampão (36 ml/h). Proteína, o—o—o; atividade inibidora da tripsina, x—x—x.

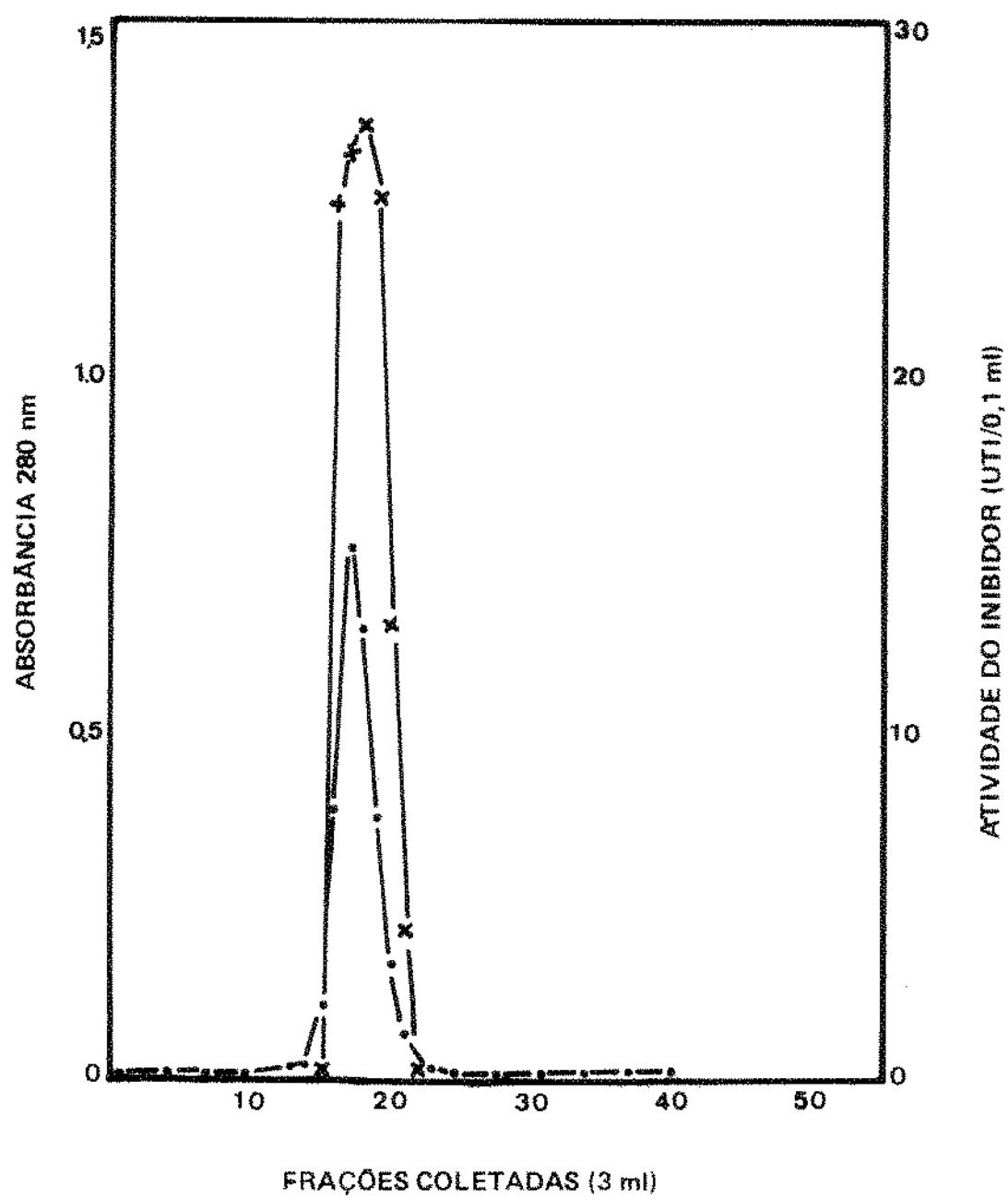


Fig. 10. Recromatografia do inibidor em coluna de Sephadex G-50 (coluna 120 x 1,0 cm). Gel equilibrado em fosfato de sódio tampão 0,01 M, pH 7,6; eluição com o mesmo tampão (24 ml/h). Absorbância 280 nm, ●-●-●; atividade inibidora da tripsina, x-x-x.

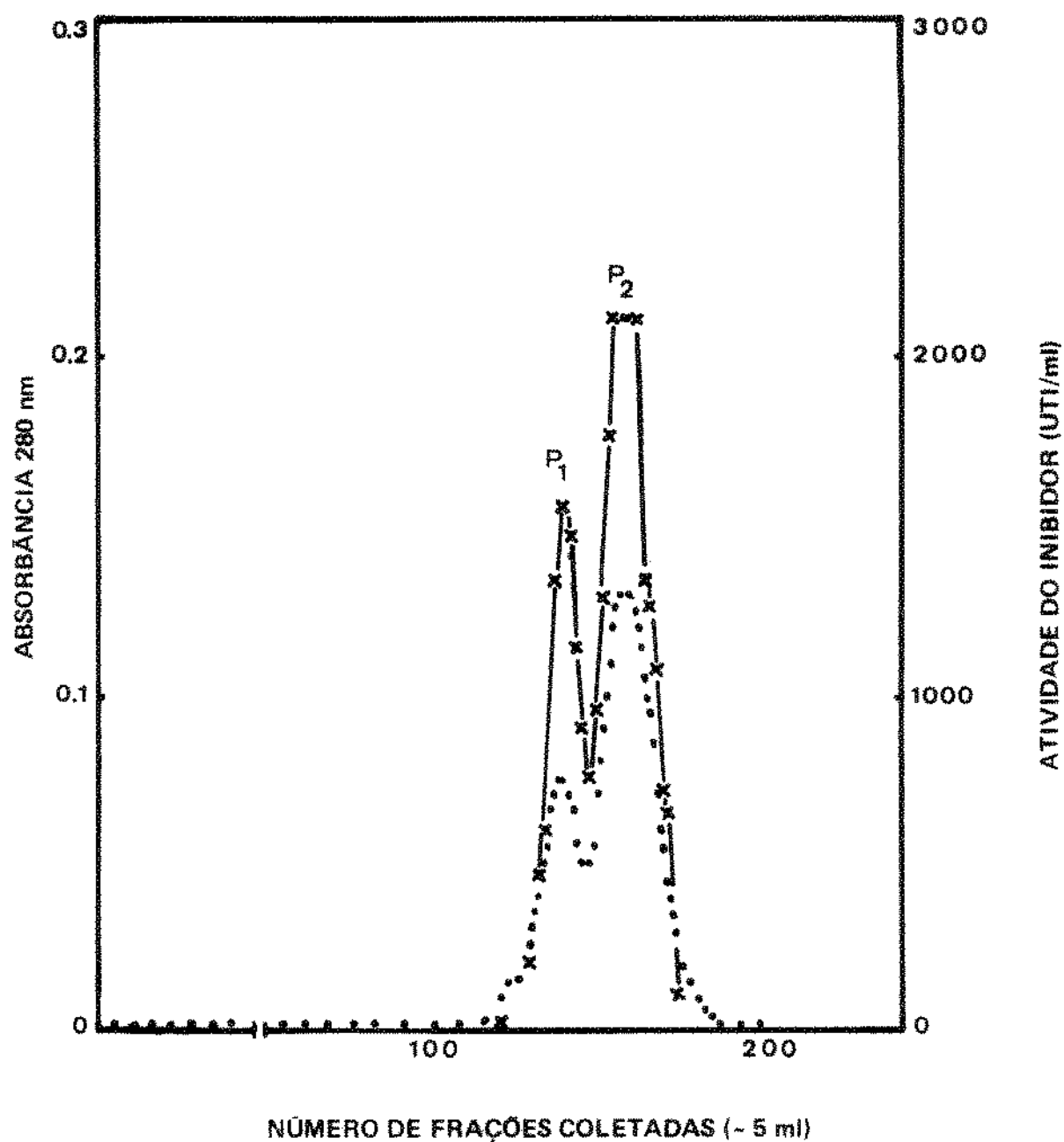


Fig. 11. Cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose (coluna 2,5 x 50 cm) dos inibidores obtidos em coluna de Sephadex G-50. Eluição com fosfato tampão 0,01 M, pH 7,6 contendo um gradiente linear (0 - 0,3 M) de NaCl. Proteína₂ ●—●—●; atividade inibidora da tripsina, x—x—x.

Quadro XII. Atividade específica, grau de purificação e porcentagem de recuperação dos inibidores de tripsina e de quimotripsina do feijão Rosinha G2 em várias fases da purificação.

Fases da purificação	Proteína (mg/ml)	Atividade (UTI/ml)	Atividade específica (UTI/mg Prot.)	Purificação (nº de vezes)	Volume (ml)	Unidades Totais (UTI)	Recuperação (%)
Extrato bruto	15,91	1871	117,6	0,0	542	1014082	100,0
Albumina solúvel em água após diálise	3,86	1824	472,5	4,0	624	1138176	112,2
Albumina não coagulável (15 min, 97°C)	1,36	1474	1083,8	9,2	516	760584	75,0
Precipitado (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,65 saturação	5,00	14375	2875,0	24,4	45	646875	63,8
Inibidor, eluído Sephadex G-50	8,18	30187	3690,0	31,4	20	603740	59,5

Quadro XIII. Atividade dos inibidores de tripsina e de quimotripsina em diversas frações protéicas isoladas do feijão Rosinha G2.

Fração protéica	Atividade (U/mg amostra)		Atividade específica (U/mg proteína)	
	Tripsina	Quimotripsina	Tripsina	Quimotripsina
IPT	235	133	380	215
F ₁	614	479	980	764
F ₃	133	119	153	137
F ₇	3848	2819	4438	3251
IG-50	5642	4011	6067	4313
B ₁	766	210	824	226
B ₂	142	67	153	72

IPT, isolado protéico total (61,94% proteína)

F₁, albumina (62,65% proteína)

F₃, re-extração do precipitado da diálise com solução 0,5M de NaCl (86,63% proteína)

F₇, precipitado da albumina não coagulável (15 min, 97°C) com sulfato de amônio 0,65 de saturação (86,70% proteína)

IG-50, inibidores eluídos da coluna de Sephadex G-50, a partir do precipitado de sulfato de amônio (93,0% proteína)

B₁, banda eluída do gel de poliacrilamida com MR 0,83 a 0,94, em relação ao corante.

B₂, banda eluída do gel de poliacrilamida com MR 0,74 a 0,83, em relação ao corante.

ca muito baixa encontrada para as bandas de inibidor, separa
das por eletroforese, do material eluído das colunas de Sepha
dex G-50. As regiões do gel de poliacrilamida correspondentes
às bandas do inibidor foram cortadas, colocadas em tubos de en
saio, esmagadas com um bastonete de vidro e, em seguida, eluí
das nos próprios tubos de diálise e dialisadas contra água des
tilada por 48h, seguido de liofilização. A atividade inibidora
foi determinada no material isolado e liofilizado. Algum compo
nente do tampão da eletroforese ou do próprio gel da acrilamida,
parece ter interferido no sentido de diminuir drasticamente a
atividade inibidora, quando determinada nas bandas separadas
eletroforéticamente. É também possível que a expressão da ativi
dade inibidora total dependa da presença de dois componentes
protéicos, que não se separam nas colunas de Sephadex G-50, se
parando-se apenas parcialmente em colunas de DEAE-celulose, nas
condições utilizadas em nossos experimentos (figura 11).

CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA DAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO ALBUMINA NOS DIVERSOS ESTÁGIOS DE PURIFICAÇÃO DO INIBIDOR

A eletroforese de disco em gel de poliacrilamida, cons
titui-se numa técnica auxiliar muito valiosa no acompanhamento
da purificação de uma proteína. A seguir são apresentados uma
série de perfis eletroforéticos das proteínas da fração albumi
na, durante o processo de purificação dos inibidores de tripsi
na e de quimotripsina.

Na figura 12, observa-se, em 1, o perfil das proteí

nas da fração albumina total (F_1); em 2, as proteínas não coaguláveis pelo aquecimento da fração F_1 a 97°C por 15 min; em 3, as proteínas da fração não coagulável que precipitaram com sulfato de amônio 0,65 de saturação; e em 4, o perfil do precipitado das albuminas não coaguláveis, depois de eluídas de uma coluna de Sephadex G-100. É importante observar o elevado grau de purificação que se consegue com o tratamento térmico da fração albumina (97°C , 15 min). Esse tratamento térmico coagula mais de 2/3 das albuminas, deixando em solução os inibidores, em uma forma tão ativa quanto no material não aquecido. A última banda colorida que se observa nos tubos em direção ao ânodo (+) é a banda do corante azul de bromofenol usado como referência. As duas bandas de mobilidades imediatamente inferiores à do corante são as bandas dos inibidores. A de maior mobilidade eletroforética, banda 1 (B_1), é o componente de maior concentração e que corresponde ao pico 2 (P_2) eluído da coluna de DEAE-celulose.

A figura 13 mostra novos perfis da albumina não coagulável (1), do precipitado com 65% de saturação de sulfato de amônio (2) e dos inibidores eluídos da coluna de Sephadex G-50 a partir do precipitado obtido com sulfato de amônio (8).

Finalmente, na figura 14 pode-se comparar, em 1 e em 2, os perfis eletroforéticos das proteínas precipitadas com sulfato de amônio, 0,65 de saturação, a partir da albumina não coagulável (97°C , 15 min); em 3, o pico 2 (P_2) eluído da coluna de DEAE-celulose (figura 11) e, em 4, a banda 1 (B_1) de maior mobi

lidade eletroforética, depois de eluída do gel de poliacrilamida e submetida a uma segunda eletroforese. O grau de purificação dessa proteína a partir do IG-50 não pode ser calculado, devido à grande perda de atividade específica ocorrida nas duas bandas com atividade inibidora quando separadas pela eletroforese e eluídas do gel de poliacrilamida.

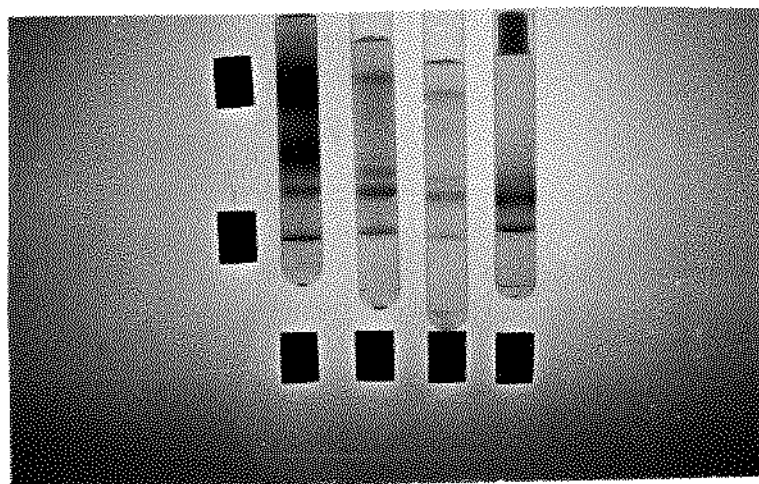


Fig. 12. Perfil eletroforético de algumas frações protéicas (albuminas) contendo os inibidores de tripsina/quimotripsina: 1 - fração albumina total; 2 - fração albumina não coagulável (97°C, 15 min); 3 - precipitado da fração albumina não coagulável (0,65 saturação); 4 - inibidores obtidos por eluição da fração albumina não coagulável, da coluna Sephadex G-100.

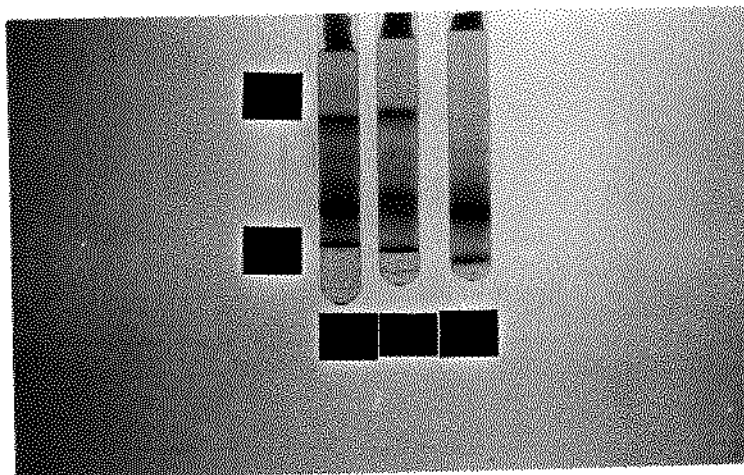


Fig. 13. Perfis eletroforéticos: da fração albumina não coagulável a 97°C, 15 min (1); do precipitado das albuminas não coaguláveis com sulfato de amônio 0,65 de saturação (2); do precipitado com sulfato de amônio, eluído de uma coluna de Sephadex G-50 (8).

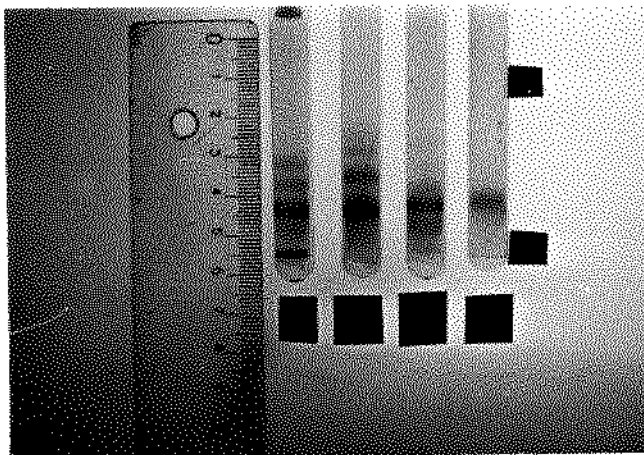


Fig. 14. Perfis eletroforéticos dos inibidores com diferentes graus de purificação: 1 e 2, fração albumina não coagulável precipitada com sulfato de amônio, 0,65 de saturação; 3, pico 2 (P_2) eluído da coluna de DEAE-celulose a partir do precipitado da fração albumina, com sulfato de amônio; 4, banda 1 (B_1) eluída do gel de poliacrilamida a partir do material obtido na coluna de Sephadex G-50 (IG-50) e submetida a uma segunda eletroforese.

COMPOSIÇÃO DOS INIBIDORES DE TRIPSINA E DE QUIMOTRIPSINA

Os inibidores de tripsina e de quimotripsina eluídos da coluna de Sephadex G-50 (IG-50) continham em média e em base seca, 15,34% de nitrogênio (95,87% de proteína) e 3,75% de carboidrato total, determinado colorimetricamente.

A composição em aminoácidos foi determinada para os inibidores isolados da coluna de Sephadex G-50 e para o material eluído no pico (P_2) da coluna de DEAE-celulose. Os resultados, em gramas de aminoácidos por 16 gramas de nitrogênio e em resíduos de aminoácidos por 20.000g de proteína, são dados no Quadro XIV.

As características marcantes da composição em aminoácidos desses inibidores são os elevados teores de treonina, serina, prolina e, particularmente, de cistina. Por outro lado, são baixas as concentrações de metionina, valina, leucina e dos aminoácidos aromáticos, verificando-se completa ausência do triptofânio. Os resultados indicam, basicamente, a mesma composição em aminoácidos para os dois materiais isolados em colunas que funcionam por princípios diferentes.

A identificação dos açúcares neutros (monossacarídeos) contidos nas moléculas dos inibidores (IG-50) foi feita por cromatografia em papel, em camada delgada e em fase líquido-gasosa, a partir de hidrolisados ácidos da proteína, após passagens sucessivas em colunas de trocas aniônica e catiônica.

A figura 15 representa um cromatograma dos açúcares neutros, feito em papel Whatman nº 1 com o material isolado do

hidrolisado de IG-50. O cromatograma foi desenvolvido no sentido descendente, usando como solvente acetato de etila/piridina/água (8:2:1 V/V), revelando-se apenas duas manchas correspondentes à manose e à xilose. As manchas do lado B representam padrões de glicose, manose e xilose, respectivamente, em ordem crescente de mobilidade; do lado A estão as duas manchas obtidas do hidrolisado de IG-50 e que correspondem à manose e à xilose dos padrões. Esse resultado foi confirmado pela cromatografia em fase líquido/gasosa dos trimetilsilil derivados. O perfil de separação desses açúcares aparece na figura 16. As retenções (cm) dos picos no cromatograma, foram comparadas com as obtidas para os derivados de substâncias padrões. Os picos 1, 2 e 3 correspondem aos obtidos com os derivados da xilose padrão, enquanto que, os picos 4 e 5 correspondem aos produzidos pela manose.

A presença de glicosamina nas moléculas dos inibidores foi constatada através das determinações dos aminoácidos nos hidrolisados, em colunas de troca iônica. No analisador de aminoácidos a glicosamina era eluída entre os picos da leucina e da tirosina.

Quadro XIV. Composição em aminoácidos dos inibidores de tripsina e de quimotripsina (IG-50) isolados em coluna de Sephadex G-50 (coluna 2,5 x 90 cm) e em coluna de DEAE-celulose, pico 2 (P₂). Coluna 2,5 x 50cm, equilibrada com tampão fosfato 0,01M, pH 7,6. Eluição com o mesmo tampão.

Aminoácido	IG-50		P ₂
	g/100g Prot.	Resíduos/M ^b	g/100g Prot.
Lisina	6,30	9	6,24
Histidina	4,88	6	5,36
Arginina	4,69	5	4,70
Ácido aspártico	18,75	28	19,74
Treonina	9,31	16	8,42
Serina	15,34	29	15,60
Ácido glutâmico	15,02	20	15,20
Prolina	6,72	12	9,37
Glicina	3,27	9	1,35
Alanina	3,48	8	3,47
1/2 cistina	11,40	18	10,40
Valina	1,11	2	1,10
Metionina	0,89	1	0,96
Isoleucina	4,36	7	4,36
Leucina	2,76	4	2,60
Tirosina	2,62	3	2,60
Fenilalamina	2,71	3	2,72
Triptofânio ^a	0,00	0	0,00

^a Determinado no hidrolisado alcalino (Blackburn, 1968).

^b Número de resíduos calculados, considerando M = 20.000 (aproximado para números inteiros).

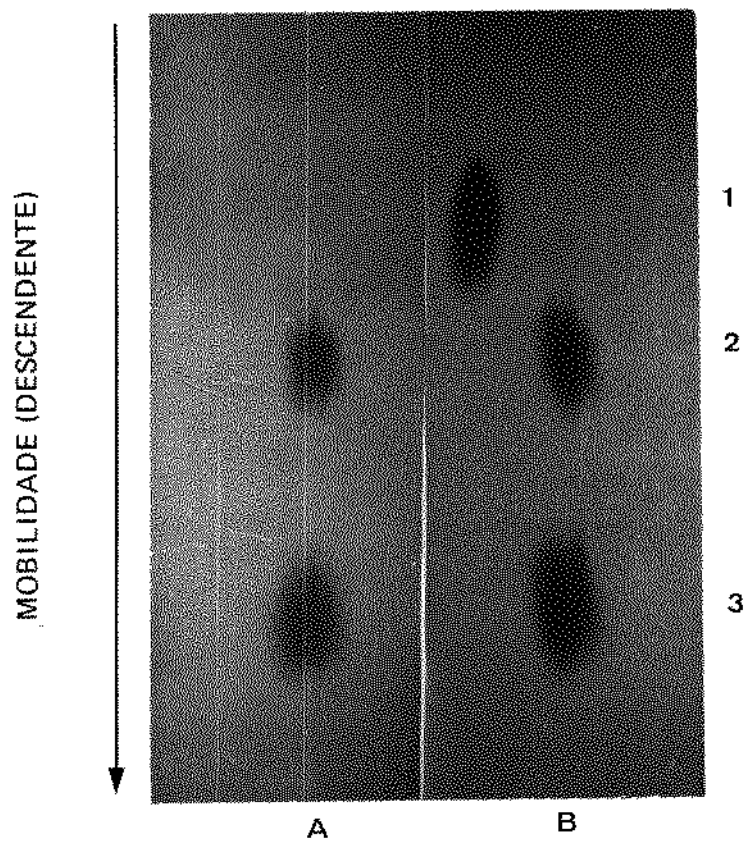


Fig. 15. Cromatograma em papel Whatman no. 1 dos açúcares neutros contidos nos inibidores (IG-50). Solvente acetato de etila/piridina/água (8:2:1 V/V); revelador, p-anisidina/ácido ftálico. A, amostra; B, padrões: 1 - glicose, 2 - manose e 3 - xilose.

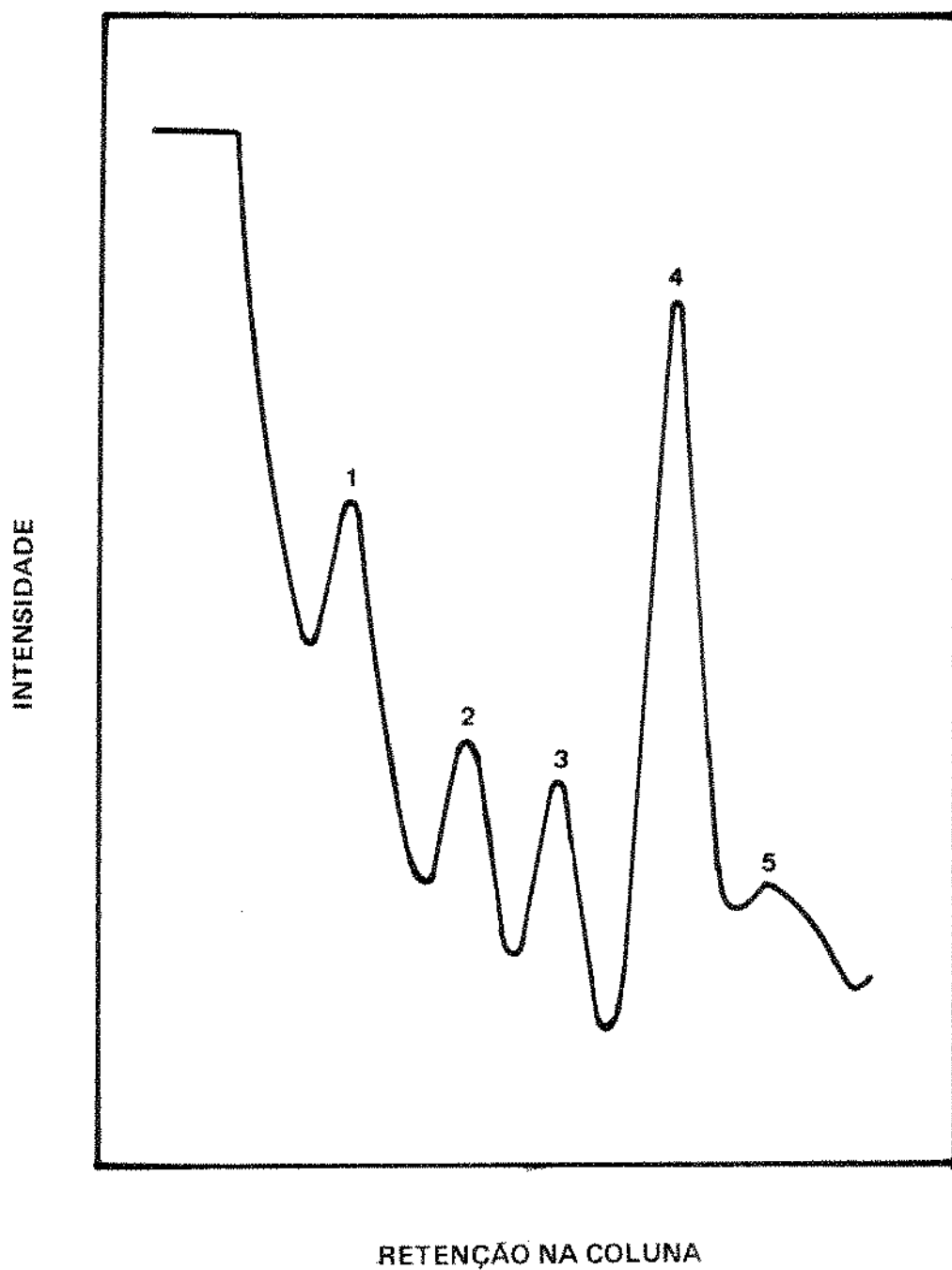


Fig. 16. Separação cromatográfica dos trimetilsilil derivados dos açúcares neutros, isolados de um hidrolisado dos inibidores IG-50. 1, 2 e 3 xilose; 4 e 5 manose. Gás de arraste N_2 (45 ml/min). Fase estacionária, Apiezon L (10%) em chromosorb W; programação (temp. 150 - 200°C, 4°C/min). Injetor 150°C, Detetor 270°C.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOQUÍMICAS DOS INIBIDORES DE
TRIPSINA E DE QUIMOTRIPSINA

Uma das propriedades mais interessantes dos inibidores de tripsina e de quimotripsina, isolados do feijão Rosinha G2, foi a sua notável resistência ao tratamento térmico.

Na figura 17 aparece a atividade inibidora da tripsina, para diferentes frações protéicas. A atividade foi determinada para um isolado protéico total (IPT), para a fração albumina (F_1), para as globulinas (F_3) e para os inibidores isolados por eluição de uma coluna de Sephadex G-100 (IG-100), sem nenhum tratamento térmico e após vários tempos de aquecimento (min) de uma suspensão aquosa a 97°C . Pode se verificar que a atividade inibidora ao invés de diminuir, aumentou com o tratamento térmico, mesmo após 60 min de aquecimento. Comportamento semelhante já havia sido constatado para os inibidores de tripsina de algumas espécies de *Phaseolus* (Fraenkel-Conrat e col., 1952; Pusztai, 1968; Jones e col., 1963). É também interessante a constatação de que, quando o grão de feijão foi aquecido a 97°C por quatro minutos apenas, a atividade inibidora da tripsina não foi mais constatada nem no extrato aquoso desses grãos nem no homogenizado integral (Quadro V).

O pH da solução teve uma influência bastante grande na inativação térmica dos inibidores de tripsina e de quimotripsina. O Quadro XV mostra os efeitos do pH sobre a inativação térmica desses inibidores. Nessa série de experimentos usou-se a fração albumina não coagulável precipitada com sulfato de amô

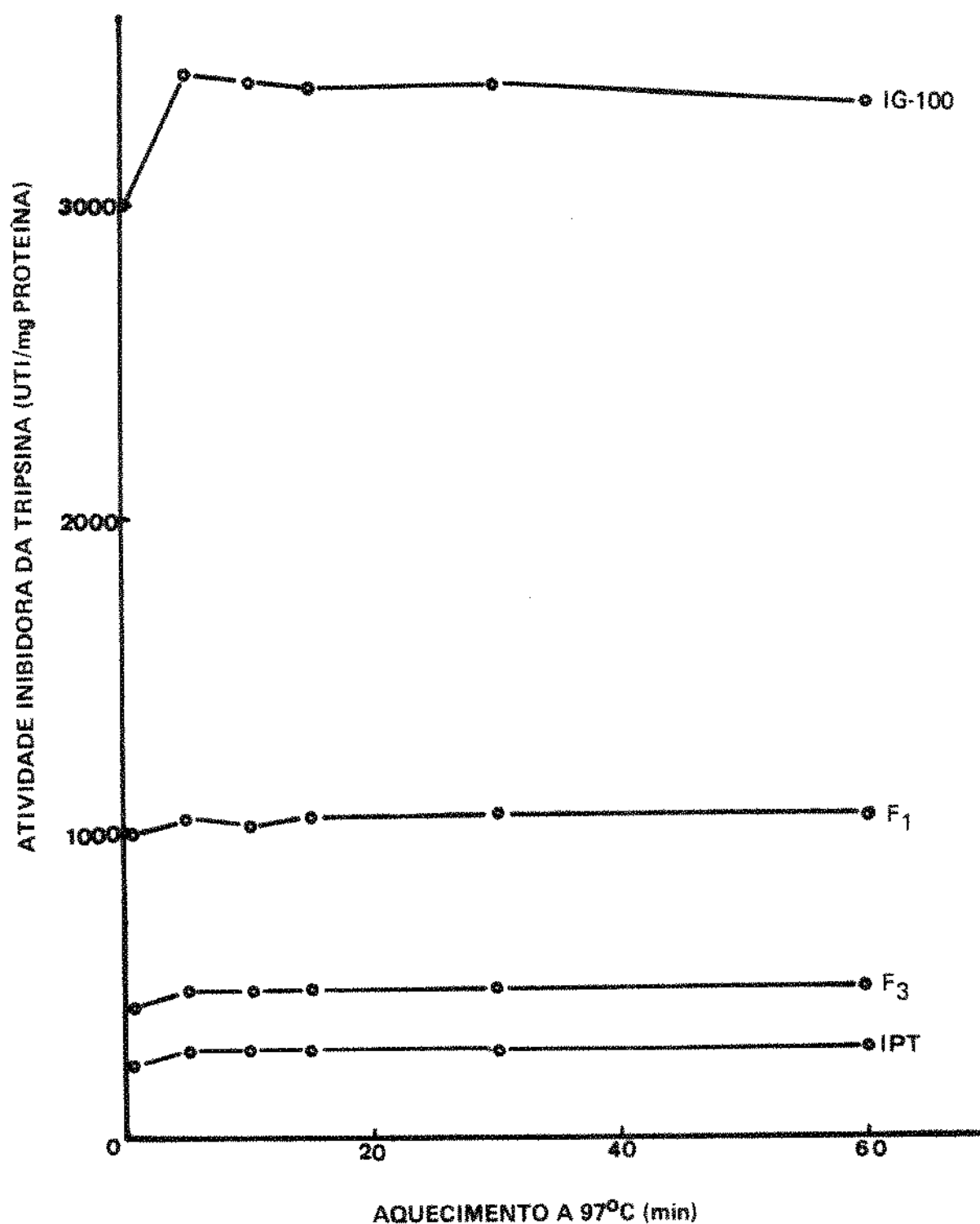


Fig. 17. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade inibidora da tripsina, em várias frações protéicas isoladas de feijão Rosinha G2. Suspensão a 1% (P/V) em água destilada. IPT, isolado protéico total; F₃, globulina; F₁, albumina; IG-100, inibidor isolado da coluna de Sephadex G-100.

nio, cujas soluções foram ajustadas a diferentes pH's e aquecidas a 97°C durante 30 minutos. Observou-se que para os valores de pH entre 2,0 e 6,0 não houve praticamente nenhuma inativação. Em pH's mais alcalinos houve uma inativação progressiva que atingiu 100% em pH 12,0.

O mesmo efeito do pH foi observado tanto para a atividade inibidora da tripsina como para a da quimotripsina, como é mostrado no Quadro XVI. Note-se que a atividade inibidora contra a quimotripsina decresceu significativamente, quando se passou do pH 2,0 para o pH 4,0, permanecendo mais ou menos estável de pH 4,0 a pH 8,0, enquanto que, a ação inibidora sobre a tripsina não sofreu, praticamente, nenhuma alteração nos pH's de 2,0 até 8,0. Em pH 10,0 os inibidores, tanto da tripsina como da quimotripsina, foram significativamente inibidos, tendo sido completamente inativados em pH 12,0.

O mesmo efeito marcante do pH sobre a resistência térmica dos inibidores foi observado quando a incubação foi feita a 130°C ao invés de 97°C. Em pH 3,8 manteve-se mais de 80% da atividade sobre a tripsina, depois de 180 min de aquecimento a 130°C, conforme mostram os dados do Quadro XVII. Já, em pH 7,0, a atividade inibidora foi completamente destruída depois de 60 min a 130°C (Quadro XVIII).

A acentuada resistência dos inibidores à inativação foi observada, também, em relação à ação de vários agentes químicos.

No Quadro XIX, estão apresentados os dados de inativa

ção dos inibidores da tripsina, depois de incubados por 4h a 50°C em soluções de uréia variando em concentrações de 0 a 8M. Nessas condições a perda de atividade inibidora foi muito reduzida, atingindo apenas cerca de 33% pela incubação em solução 8M de uréia.

A diálise dessas preparações, em água destilada ou em tampão fosfato de sódio 0,01M pH 7,6 por 48h, após incubação com as soluções de uréia não alterou, praticamente, a atividade inibidora residual.

Os inibidores purificados mostraram-se bastante sensíveis à ação dos agentes redutores de ligações dissulfídicas como mercaptoetanol e ditiotreitól. A incubação dos inibidores por duas horas a 37°C, em soluções contendo mercaptoetanol nas concentrações de 20 a 200mM destruiu de 53 a 71% da atividade inibidora (Quadro XX). A diálise das preparações, em água destilada por 48 horas a 4°C, produziu uma elevação da atividade inibidora de aproximadamente 30% em relação à atividade residual determinada antes da diálise.

A inativação pelo ditiotreitól em diversas concentrações após incubação de 30 min com os inibidores (IG-50) a 25°C e a 97°C, pode ser verificada nos Quadros XXI e XXII, respectivamente. A 25°C a concentração de 200mM de ditiotreitól na solução inativou apenas 46,5% da atividade inibidora. A solução 10mM de DTT inativou apenas 9,2%. Quando a incubação foi feita a 97°C, a concentração de DTT necessária para a completa inativação dos inibidores foi de apenas 0,81mM, como mostram os da

dos do Quadro XXII.

A oxidação do IG-50 com ácido perfórmico, seguido de diálise e liofilização deu também um produto desprovido de qualquer atividade inibidora sobre tripsina e/ou quimotripsina.

A rápida inativação dos inibidores, com reagentes capazes de romper ligações dissulfídicas, associada ao elevado teor de cisteína (1/2 cistina) em sua composição, sugeria que grande parte da cisteína poderia estar formando pontes dissulfídicas nas moléculas dos inibidores, existindo poucos grupos sulfidrilos livres.

Para testar essa hipótese foram realizadas uma série de reações de alquilação dos inibidores, e da glutatona como controle, usando N-etilmaleimida (NEM) como reagente. Os resultados obtidos nesses testes são mostrados no Quadro XXIII. A reação da N-etilmaleimida com substâncias contendo grupos sulfidrilos (-SH) livres provoca uma diminuição na leitura da absorbância a 380nm, como pode ser visto para o caso da glutatona. Ao contrário, a presença e o aumento da concentração dos inibidores na mistura de reação, não provocou nenhuma alteração na absorbância a 380nm, o que parece indicar ausência de grupos sulfidrilos livres em suas moléculas.

O peso molecular dos inibidores purificados (IG-50) foi estudado por ultracentrifugação em gradiente de densidade, por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) e por ultrafiltração em coluna de Sephadex G-100.

Quadro XV. Influência do pH na inativação térmica (97°C, 30 min) dos inibidores da tripsina precipitados da fração albumina não coagulável (97°C, 15 min) com sulfato de amônio 0,65 de saturação. Soluções com 0,1 mg do precipitado liofilizado, por mililitro.

Tratamento (pH) ^a	Atividade inibidora (UTI/0,2 ml) ^b	Inativação dos inibidores (%)
2,0	81,0	0,0
3,8	80,0	0,0
4,0	78,0	2,5
5,5 (controle)	80,0	0,0
6,0	75,9	5,2
8,0	69,7	12,9
9,0	67,6	15,5
10,0	50,3	37,2
11,0	11,8	85,3
12,0	0,0	100,0

^a Não houve nenhuma inativação nos tubos mantidos nos mesmos pH's, porém, à temperatura ambiente.

^bUTI = unidades de tripsina inibidas. A atividade foi determinada em tampão fosfato 0,1M pH 7,6.

Quadro XVI. Influência do pH na inativação térmica dos inibidores de tripsina e da quimotripsina, aquecidos a 97°C por 30 minutos. Soluções contendo 0,5 mg/ml do precipitado com sulfato de amônio 0,65 de saturação, diluído 1:5 para o teste de atividade.

PH	Atividade das enzimas		Atividade dos inibidores	
	Tripsina (UT) ^a	Quimotripsina (UQT) ^b	Tripsina (UTI/0,3ml) ^c	Quimotripsina (UQTI/0,3ml) ^d
2	15,4	5,8	137,7	146,0
4	7,8	58,1	145,3	93,7
6	6,2	59,1	146,9	92,7
8	22,4	54,5	130,7	97,3
10	138,8	119,6	14,3	32,2
12	153,1	151,8	0,0	0,0

^a_{UT} = unidades de tripsina

^b_{UQT} = unidades de quimotripsina

^c_{UTI} = unidades de tripsina inibidas

^d_{UQTI} = unidades de quimotripsina inibidas

Quadro XVII. Influência do tempo de incubação (130°C) na inativação térmica dos inibidores de tripsina do precipitado da fração albumínica não coagulável (97°C, 15 min) com sulfato de amônio 0,65 de saturação. Soluções contendo 0,5 mg/ml do precipitado ajustado pH 3,8 diluídas 1:3 para o teste de atividade.

Incubação (min)	Atividade da tripsina (UT) ^a	Atividade inibidora (UTI/0,1ml) ^b	Inativação térmica dos inibidores (%)
0	22,4	172,6	0,0
30	42,8	152,2	11,8
60	85,3	109,7	36,5
90	128,5	66,5	61,5
120	135,3	59,7	65,4
150	139,9	55,0	68,2
180	163,3	31,7	81,6

^aUT = unidades de tripsina

^bUTI = unidades de tripsina inibidas

Quadro XVIII. Influência do tempo de incubação (130°C) na inativação térmica dos inibidores de tripsina precipitados da fração albumina não coagulável (97°C, 15 min) com sulfato de amônio 0,65 de saturação. Soluções contendo 0,5mg/ml, do precipitado, ajustado pH 7,0 com solução de NaOH, diluídas 1:3 para o teste de atividade.

Incubação (min)	Atividade da tripsina (UT) ^a	Atividade inibidora (UTI/0,1ml) ^b	Inativação térmica dos inibidores (%)
0	10,2	160,3	0,0
15	16,1	154,4	3,7
30	106,4	64,1	60,0
40	115,2	55,3	65,5
50	121,8	48,7	69,6
60	170,5	0,0	100,0

^aUT = unidades de tripsina

^bUTI = unidades de tripsina inibidas

Quadro XIX. Influência da concentração de uréia na inativação dos inibidores de tripsina precipitados da fração albumina não coagulável (15 min, 97°C) com sulfato de amônio 0,65 de saturação. Solução a 0,5% de precipitado liofilizado, diluído 1:5. Incubação de 4h a 50°C.

Concentração de uréia (M)	Atividade da tripsina (UT) ^a	Atividade inibidora (UTI/0,2ml) ^b	Inativação dos inibidores (%)
0	85,3	78,0	0,0
2	87,4	75,9	2,7
4	91,5	71,8	8,0
6	95,7	67,6	13,4
8	110,8	52,5	32,7

^aUT = unidades de tripsina

^bUTI = unidades de tripsina inibidas

Quadro XX. Efeito da concentração de mercaptoetanol na inativação dos inibidores de tripsina isolados da coluna de Sephadex G-50, a partir do precipitado de sulfato de amônio 0,65 de saturação^a.

Concentração de mercaptoetanol (mM)	Atividade da tripsina (UT) ^b	Atividade inibidora (UTI) ^c	Inativação dos inibidores (%)
0	0,0	151,3	0,0
20	79,6	71,7	52,7
40	98,5	52,8	65,1
60	112,6	38,7	74,5
80	114,7	36,6	75,8
100	117,0	34,3	77,4
200	107,5	43,8	71,1

^aEm todos os ensaios usaram-se 50 µg de enzima e 50 µg de inibidores. Incubação prévia dos inibidores com mercaptoetanol durante 2 horas a 37°C.

^bUT = unidades de tripsina

^cUTI = unidades de tripsina inibidas

Quadro XXI. Efeito da concentração de ditioneitol (DTT) na inativação dos inibidores de tripsina isolados em coluna de Sephadex G-50 (ÍG-50). Solução contendo 0,4 mg/ml. Pré-incubação de 30 min a 25°C antes do teste de atividade.

Concentração de DTT (mM)	Atividade da tripsina (UT) ^a	Atividade inibidora (UTI/0,05ml) ^b	Inativação dos inibidores (%)
0	79,2	44,8	0,0
10	83,3	40,7	9,2
20	85,3	38,7	13,7
30	87,4	36,6	18,4
40	89,4	34,6	22,8
50	93,6	30,4	32,2
100	95,7	28,3	36,9
200	100,0	24,0	46,5

^aUT = unidades de tripsina

^bUTI = unidades de tripsina inibidas

Quadro XXII. Efeito da concentração de ditioneitol (DTT) na inativação dos inibidores de tripsina isolados do precipitado de sulfato de amônio 0,65 de saturação, em coluna de Sephadex G-50 (IG-50). Solução contendo 0,4 mg/ml. Pré-incubação de 30 min a 97°C antes do teste de atividade.

Concentração de DTT (mM x 10 ²)	Atividade da tripsina (UT) ^a	Atividade inibidora (UTI/0,05ml) ^b	Inativação dos inibidores (%)
0,00	32,3	140,6	0,0
1,26	37,5	135,4	3,7
2,53	41,0	131,9	6,2
5,06	46,4	126,5	10,1
10,11	75,2	97,7	30,5
20,25	97,9	75,0	46,7
40,50	142,2	30,7	78,2
81,00	172,9	0,0	100,0

^aUT = unidades de tripsina

^bUTI = unidades de tripsina inibidas

Quadro XXIII. Reação da N-etilmaleimida (NEM) com grupos sulfidrilos livres dos inibidores (IG-50) e da glutationa (GSH). Em todas as misturas a concentração final de NEM foi 1×10^{-3} ($A_{380\text{nm}} = 0,600$).

Concentrações ^a	Absorbância dos tubos testes (380nm)	Grupos sulfidrilos livres calculados (μmoles)
GSH		
$0,1 \times 10^{-3}\text{M}$	0,525	$0,12 \times 10^{-3}$
$0,2 \times 10^{-3}\text{M}$	0,465	$0,21 \times 10^{-3}$
$0,5 \times 10^{-3}\text{M}$	0,280	$0,51 \times 10^{-3}$
$1,0 \times 10^{-3}\text{M}$	0,000	$0,97 \times 10^{-3}$
IG-50		
1,5 mg	0,625	0,00
2,5 mg	0,630	0,00
7,5 mg	0,625	0,00

^a Concentrações finais de GSH ou de IG-50 nas misturas de reação.

No método de ultracentrifugação, usou-se um gradiente de sacarose (0 a 20%) e desidrogenase láctica como padrão interno, de coeficiente de sedimentação e peso molecular conhecidos.

Na figura 18 vêem-se as posições relativas das bandas de sedimentação no gradiente, da LDH e do IG-50. Os dados desse e de outros experimentos semelhantes permitiram o cálculo do coeficiente de sedimentação (S) para os inibidores em IG-50 que foi de $2,0 \pm 0,2$. Esses dados de sedimentação no gradiente de sacarose permitiram calcular um valor médio para o peso molecular dos inibidores de 20.400.

O peso molecular desses inibidores foi determinado também pelos dados de ultrafiltração em colunas de Sephadex G-100 (50 x 2,5cm).

No Quadro XXIV encontram-se os parâmetros de peso molecular e os dados experimentais obtidos para uma série de proteínas tomadas como padrão e para os inibidores. A análise de regressão desses dados permitiu o estabelecimento da equação ($\log_{10} PM = 5,87 - 0,577 V_e/V_o$) e da reta da figura 19. O valor V_e/V_o determinado experimentalmente para os inibidores, quando aplicado à equação de regressão, deu um peso molecular de 20.000, bastante próximo do valor 20.400 determinado pelo coeficiente de sedimentação ($S = 2,0$).

A eletroforese de proteínas de pesos moleculares conhecidos, em gel de poliacrilamida contendo SDS, permitiu a construção da curva padrão da figura 20. Essa é uma curva semilogarítmica dos pesos moleculares contra a mobilidade relativa das proteínas no gel. As mobilidades eletroforéticas dos inibidores,

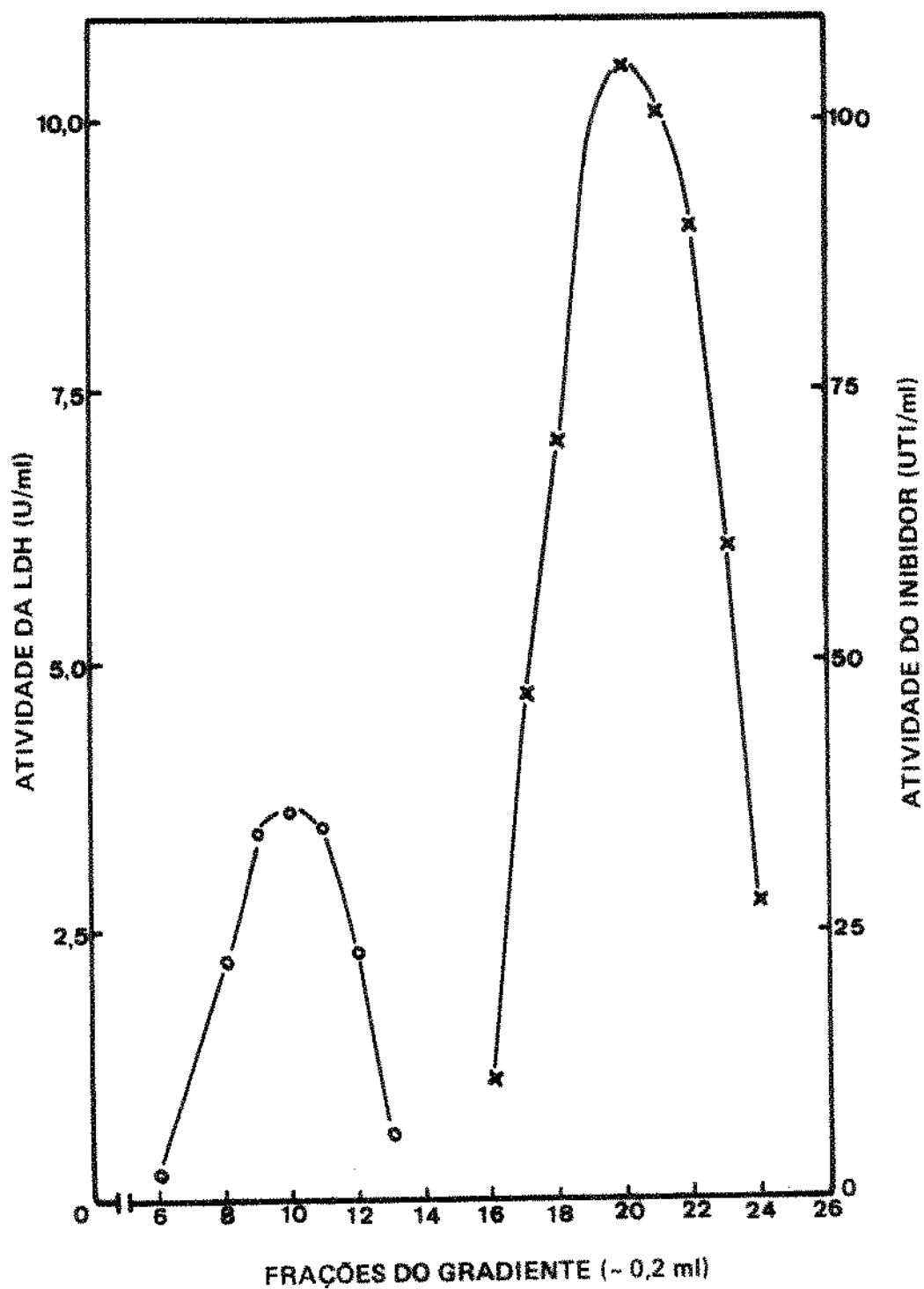


Fig. 18. Picos de sedimentação da desidrogenase láctica (LDH) e dos inibidores de tripsina e de quimotripsina (IG-50) submetidos à ultracentrifugação em gradiente de densidade (5-20 % de sacarose) 16h a 175.000 x G. o—o, LDH x—x, inibidores IG-50.

Quadro XXIV. Parâmetros utilizados para a determinação do peso molecular dos inibidores (IG-50), obtidos pela eluição das proteínas de colunas de Sephadex G-100 (50 x 2,5 cm). Eluição com tampão de fosfato de sódio 0,01M, pH 7,6.

Proteínas	Peso Molecular (PM)	$\log_{10}$ PM	Volume de eluição (V_e)	Volume livre (V_o)	Relação (V_e/V_o)
Lisozima	14.100	4,15	203,8	65,8	3,10
Mioglobina	16.900	4,23	184,5	68,3	2,70
Quimotripsina	22.500	4,35	170,0	67,0	2,53
Pepsina	35.000	4,54	161,1	66,5	2,42
Albumina de soro bovino	67.000	4,83	121,9	65,8	1,85
Inibidores (IG-50)	20.000 ^a	4,30 ^a	184,8	67,8	2,72

^a Valores determinados pela equação de regressão da figura 19.
 $\log_{10} PM = 5,87 - 0,577 V_e/V_o$.

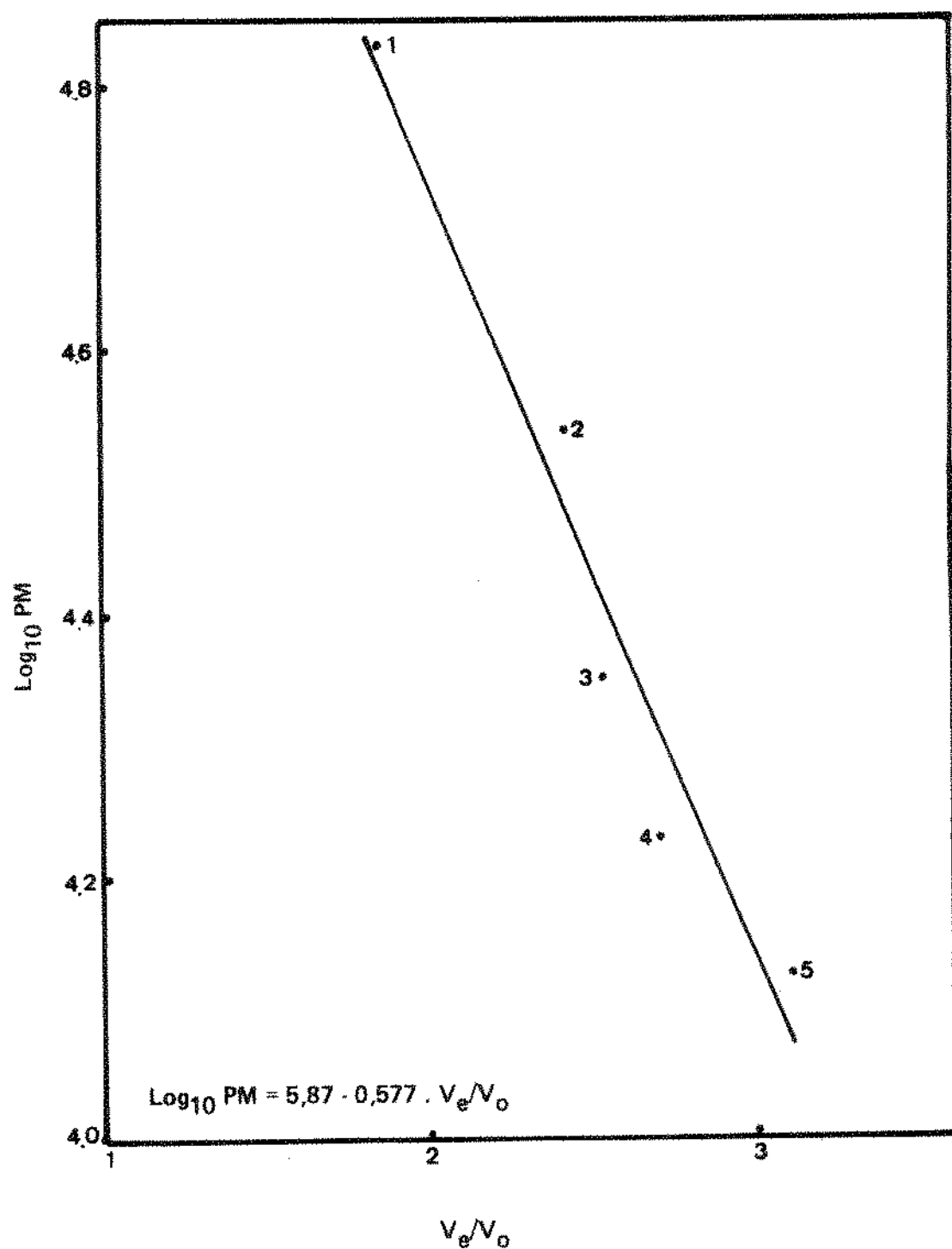


Fig. 19. Curva padrão para determinação de peso molecular (PM) por ultrafiltração em gel Sephadex G-100, Coluna 2,5 x 50 cm, equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,6; eluição com o mesmo tampão (18 ml/h), temperatura 25°C. 1. albumina de soro bovino PM 67.000; 2. pepsina, PM 35.000; 3. quimotripsina, PM 22.500; 4. Mioglobina, PM 16.900; 5. lisozima de clara de ovo, PM 14.100.

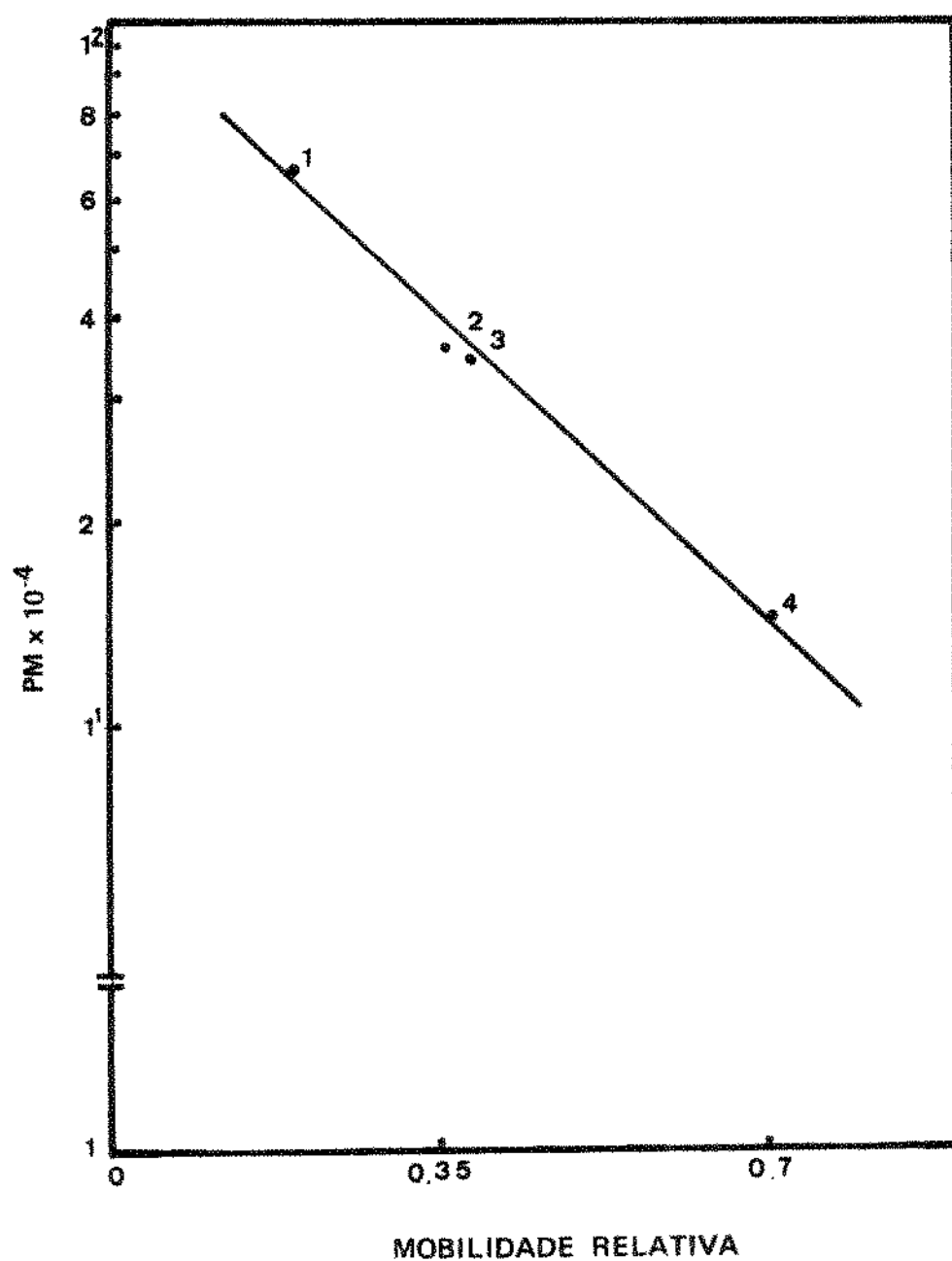


Fig. 20. Curva semi-logarítmica do PM versus mobilidade eletroforética de proteínas padrões, em gel de poliacrilamida contendo SDS. 1. albumina de soro bovino, PM 65.000; 2. desidrogenase láctica, PM 36.000; 3. pepsina, PM 35.000; 4. lisozima, PM 14.100.

relativas às proteínas utilizadas como padrão, permitiram o cálculo de seu peso molecular que foi de 20.000 ± 1.000 , nas várias determinações. Portanto, os valores encontrados para o peso molecular dos inibidores (IG-50), por três métodos diferentes, mostraram boa concordância, sugerindo o valor 20.000 como o PM mais provável.

Os dados da ultrafiltração em colunas de Sephadex permitiram o cálculo de vários parâmetros moleculares dos inibidores IG-50, além do peso molecular.

O coeficiente de distribuição ou de partição no gel (K_D) foi calculado a partir das seguintes relações estabelecidas por Porath e Flodin (1959).

$$V_t = V_g + V_o + V_i \quad (1)$$

$$V_e = V_o + K_D V_i \quad (2)$$

$$K_D = (V_e - V_o)/V_i \quad (3)$$

$$\begin{aligned} V_t &= \text{volume da coluna ou cilindro (50 x 2,5cm)} \\ &= 245 \text{ cm}^3 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} V_o &= \text{volume externo determinado experimentalmente} \\ &(\text{para os inibidores } V_o = 67,8 \text{ cm}^3) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} V_g &= \text{volume ocupado pela matriz de gel} \\ (V_g = V_t/B.d) &= 7,47 \text{ cm}^3, \text{ em que:} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} B &= \text{volume específico do Sephadex G-100 seco} \\ &(20 \text{ cm}^3/\text{g}) \end{aligned}$$

d = densidade do Sephadex G-100 seco
 $(1,64\text{g/cm}^3)$

V_i = volume interno de embebição do gel

$$V_i = V_t - (V_g + V_o) = 169,7 \text{ cm}^3$$

Utilizando-se da equação (3) calcularam-se os coeficientes de distribuição para os inibidores ($K_D = 0,69$) e para as demais proteínas usadas como padrão.

O raio molecular de Stokes a foi calculado para os inibidores pelo método de Ackers (1967), usando-se a seguinte equação:

$$K_D = \emptyset = \text{erfc} \left[\frac{a - a_o}{b_o} \right] = 1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \cdot \int_0^{(a-a_o)/b_o} e^{-a^2} da \quad (4)$$

A resolução da equação (4) para o parâmetro ($a = a_s$), resulta na seguinte expressão:

$$a_s = a_o + b_o \cdot \text{erfc}^{-1}(K_D) \quad (5)$$

No estabelecimento dessas equações assumiu-se:

- 1) que as microregiões no interior do gel são heterogêneas em tamanho; 2) individualmente, uma microregião pode ser caracterizada pelo raio a_s , da maior molécula passível de ser acomodada

no interior dessa região e; 3) a frequência de distribuição dos tamanhos moleculares, no interior do gel, pode ser representada por uma curva de probabilidade gaussiana.

Na Equação (5), a_0 é a posição de valor máximo da distribuição K_D e b_0 é uma medida do desvio padrão. O termo erfc é a função erro que pode ser encontrada em tabelas de probabilidade (Weast and Selby, 1966) e aplicada para substâncias de raios moleculares conhecidos. A partir de erfc , pode-se calcular $\text{erfc}^{-1}(K_D)$ utilizando-se dos valores encontrados para K_D , tanto para os padrões como para os inibidores.

A análise de regressão dos dados encontrados experimentalmente permitiu o estabelecimento da equação ($a_s = 11,2 + 32,68 \text{erfc}^{-1}K_D$), representada pela reta da figura 21. O valor de $\text{erfc}^{-1} = 0,28$ calculado para os inibidores e aplicado à equação de regressão da figura 21, deu um raio molecular de $20 \text{ \AA}$ ($a_s = 20 \text{ \AA}$) para os inibidores.

Conhecido o raio molecular de Stokes, calculou-se para os inibidores o coeficiente de difusão (D) pela equação estabelecida por Einstein em 1905, citada por Moore (1964).

$$D = \frac{KT}{f} = \frac{KT}{6\pi \eta a} \quad (6)$$

K = constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-16} \text{ g.cm}^2 \cdot \text{seg}^{-2} \cdot \text{molec}^{-1} \cdot ^\circ\text{K}^{-1}$); $T = ^\circ\text{K}$ (293); e η = coeficiente de viscosidade do meio.

$a = a_s = \text{Raio molecular de Stokes (20 \AA)}$

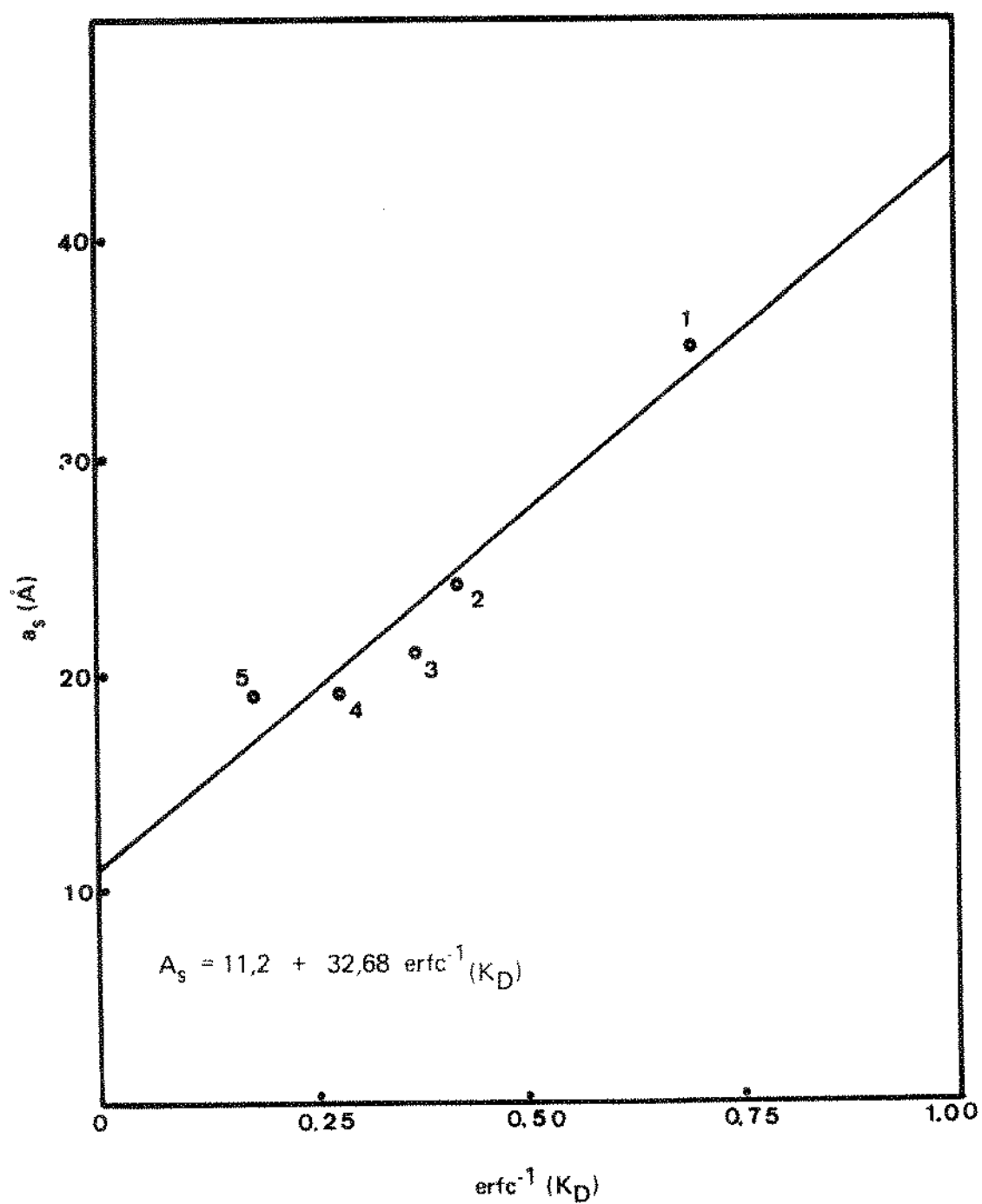


Fig. 21. Curva padrão do raio molecular de Stokes (a_s) versus função erro complementar inversa para K_D . 1. albumina de soro bovino, $a_s = 35$ Å; 2. pepsina, $a_s = 24$ Å; 3. quimotripsina, $a_s = 21$ Å; 4. mioglobina, $a_s = 19$ Å; 5. lisozima, $a_s = 19$ Å.

A equação (6) descreve a difusão de uma partícula em uma solução de diluição infinita. Para o cálculo da difusão, a viscosidade (η) da solução experimental foi considerada igual à da água a 20°C, isto é, $\eta = 1,0 \times 10^{-2} \text{ g. cm}^{-1} \cdot \text{seg}^{-1}$. O uso da equação (6) deu um valor de difusão $D = 10,7 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{seg}^{-1}$ para os inibidores.

O volume específico parcial ($\bar{v} = 0,69$), para os inibidores, foi calculado com base na composição de aminoácidos do IG-50 (Quadro XIV) de acordo com o procedimento descrito por Schachman (1957).

Conhecidos o peso molecular, o volume específico parcial e o coeficiente de difusão de uma proteína, é possível se obter informações preliminares sobre a forma dessa proteína em solução, calculando-se o quociente friccional f/f_0 . O desvio de f/f_0 do valor unitário mede a assimetria e o grau de hidratação da molécula de proteína.

O parâmetro (f) pode ser calculado pela Equação (6), que para o caso dos inibidores foi de $3,78 \times 10^{-8} \text{ g. seg}^{-1}$. Fisicamente, f_0 representaria o coeficiente friccional para uma proteína que fosse perfeitamente esférica e não hidratada. O valor de f_0 pode ser calculado pela equação (7) desenvolvida por Einstein e Smoluchowski, dada por Springall (1954).

$$f_0 = \eta (162 \pi^2 M/N)^{1/3} \quad (7)$$

η - viscosidade da água a 20°C ($1 \times 10^{-2} \text{ g. cm}^{-1} \cdot \text{seg}^{-1}$)

M - peso molecular (2×10^4 daltons)

$\bar{v}$ - volume específico parcial ($0,69 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)

N - número de Avogadro ($6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)

A substituição desses valores na Equação (7) deu um valor $f_0 = 3,32 \times 10^{-8} \cdot \text{g} \cdot \text{seg}^{-1}$, que, quando relacionado com o valor de f , forneceu um quociente friccional $f/f_0 = 1,14$, bastante próximo da unidade.

Os valores citados na literatura para f/f_0 variam entre 1,0, por exemplo, para a tripsina e 6,8 para o colágeno (Moore, 1964). Uma proteína com $f/f_0 = 1$ deveria ser praticamente esférica e não solvatada quando em solução.

O quociente f/f_0 combina as variáveis de forma da molécula e grau de hidratação.

De acordo com o diagrama de Oncley, dado por Springall (1954) o valor de $f/f_0 = 1,14$ encontrado para os inibidores, poderia ser assim interpretado: a) assumindo que as moléculas se apresentam não hidratadas, então a sua forma poderia ser a de um elipsóide do tipo oblato ($a < b$) de relação axial $a/b = 0,25$ em que a , é o semi-eixo de rotação ou de um elipsóide prolato ($a > b$) de relação axial $a/b = 4$; b) assumindo que as moléculas possuam forma esférica, então elas deveriam estar hidratadas com 0,4g de água por grama de proteína.

Os pH's isoelétricos (PI) das duas proteínas que compõem a preparação IG-50 foram determinados por isoeletrofocalização em gel de poliacrilamida, contendo uma mistura de anfólitos na faixa de pH entre 3,0 e 10,0. As curvas da figura 22 re

presentam os perfis de pH, e de atividade dos inibidores, quando eluídos das secções de 0,5cm cortadas do gel. A curva de atividade dos inibidores revelou dois picos com pH's isoeletrícos (PI) 6,1 e 5,0 a partir do topo do tubo, respectivamente.

O espectro de absorção dos inibidores em IG-50 mostrou um único pico com máxima absorção entre 275-280nm. A absorvidade a foi determinada em tampão fosfato de sódio 0,01M pH 7,6, contendo 1mg/ml de IG-50, em uma célula de passagem ótica de 1cm. Usando-se a expressão conhecida para absorbância $A = -\log_{10} T = abc$, encontrou-se, para a absorvidade, $a = 0,400 \text{ mL. mg}^{-1}. \text{ cm}^{-1}$. Assumindo o valor 20.000 para o peso molecular, calculou-se a absorvidade molar, $\epsilon = 8 \times 10^3 \text{ L. mol}^{-1}. \text{ cm}^{-1}$.

A figura 23 mostra as curvas de inibição para tripsina e para quimotripsina, quando se usou caseína como substrato. A inibição foi linear e estequiométrica para a tripsina, sendo que 1 miligrama de IG-50 inibiu completamente 1 miligrama de tripsina bovina. No caso da quimotripsina, a inibição não foi linear em função da concentração de inibidor, originando uma curva aparentemente bifásica em que na primeira fase a relação IG-50/enzima, para completa inibição, foi de 1,25, enquanto que na segunda fase, essa relação esteve entre 2 a 3 miligramas de IG-50 para 1 miligrama de quimotripsina.

Uma série de experiências foram feitas com a finalidade de provar ou refutar a existência de dois centros de ligação independentes nos inibidores, uma para tripsina e outro para a quimotripsina.

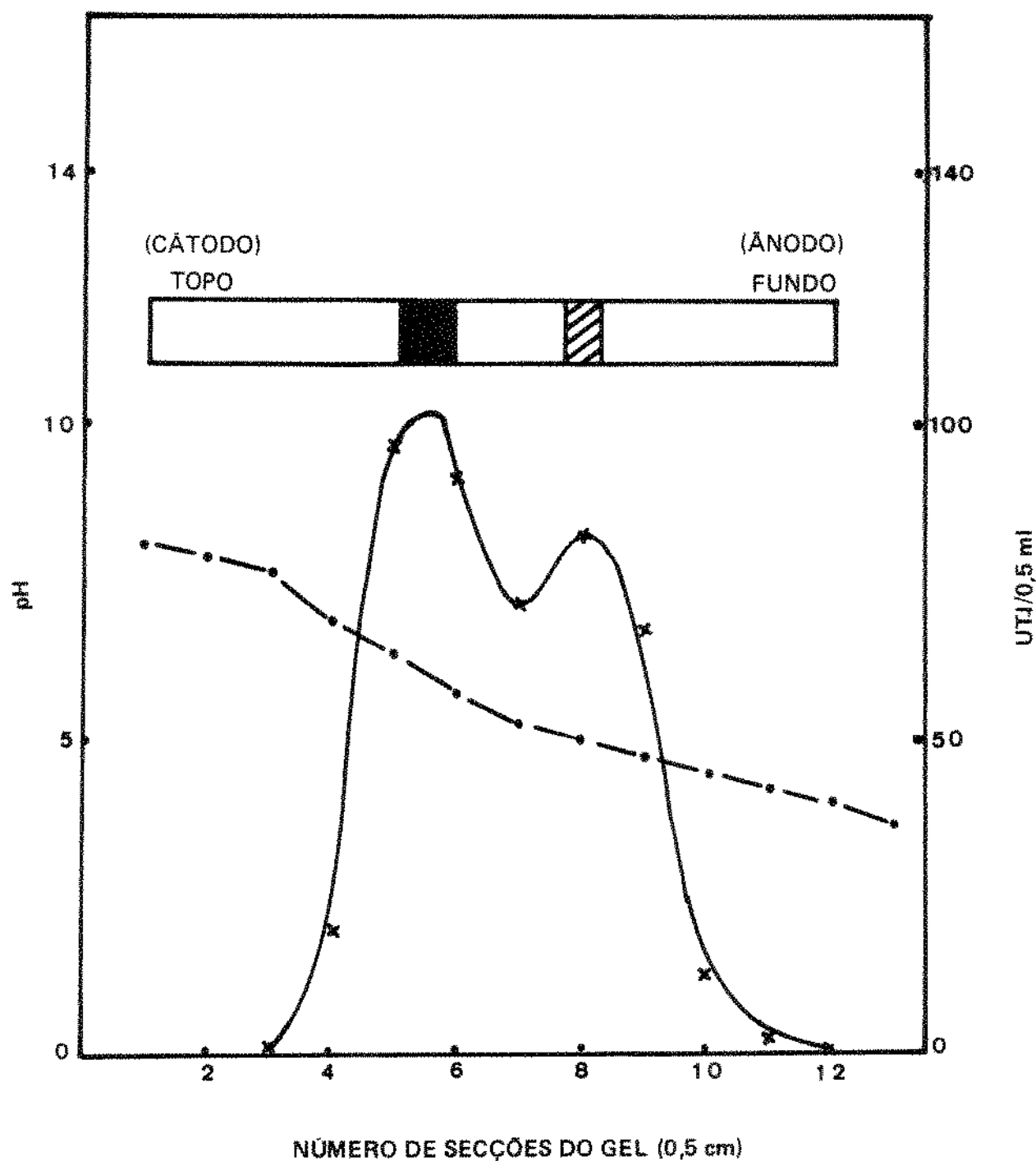


Fig. 22. Representação gráfica da isoeletrofocalização dos inibidores de tripsina (IG-50) em gel de poliacrilamida contendo uma mistura de anfólitos de pH entre 3,0 e 10,0. Curva de pH, ●—●—●; atividade inibidora sobre a tripsina, x—x—x.

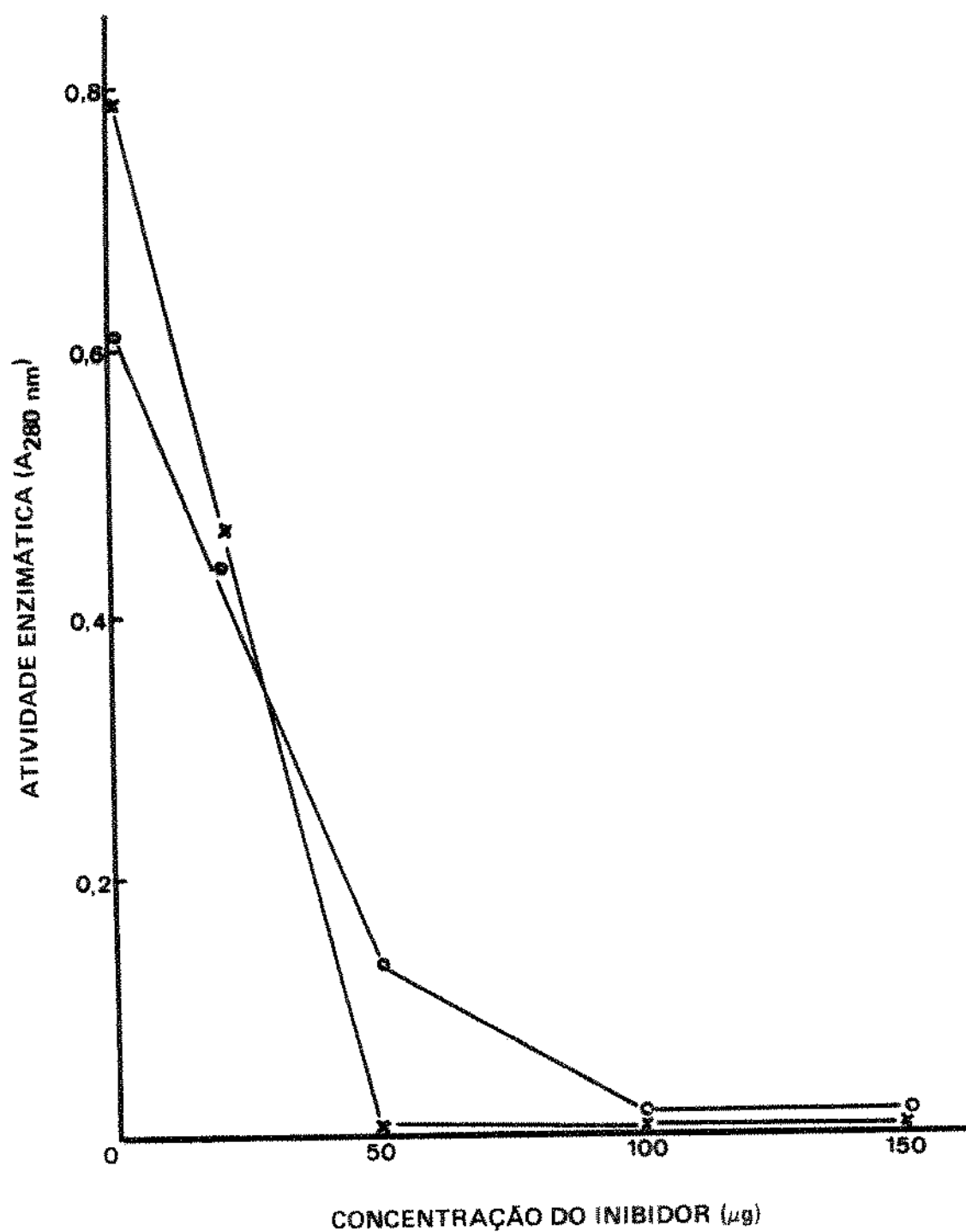


Fig. 23. Inibição da tripsina e da quimotripsina (50 μ g) em função da concentração dos inibidores na mistura de reação. Tripsina, x-x-x; Quimotripsina, o-o-o.

Os resultados dessas experiências são mostrados no Quadro XXV, e parecem indicar a existência, nos inibidores, de centros de ligação independentes para tripsina e para quimotripsina. Esse tipo de inibidor é conhecido na literatura como de dupla cabeça (double headed).

A pré-incubação dos inibidores com pepsina a pH 1,6, durante 60 minutos, seguido de adição de substrato (ovalbumina) e incubação por mais 2 horas a 37°C não produziu nenhuma inativação da pepsina. Os inibidores pré-incubados com a pepsina mantiveram-se totalmente ativos contra tripsina e quimotripsina.

Os inibidores não perderam nenhuma atividade, quando mantidos em solução 0,1N de HCl (pH 1,6) por 48 horas, a 37°C.

A ação antiproteolítica dos inibidores em IG-50 foi testada, também, contra tripsina humana. O Quadro XXVI mostra, comparativamente, o poder de inibição do IG-50 contra as tripsinas humana e bovina. Os resultados indicam uma atividade inibidora 3,6 vezes mais elevada contra a tripsina humana que contra a tripsina bovina.

O tipo de inibição e o mecanismo de ação desses inibidores antiproteolíticos ainda não são bem conhecidos. O estudo da cinética e do mecanismo da reação é muito difícil devido à complexidade do substrato que, no caso da caseína, se desconhecem inclusive sua estrutura e seu peso molecular. Outro fator de complicação é a natureza dos próprios inibidores dos quais não se conhecem, na maioria dos casos, suas estruturas e seus centros ativos.

Quadro XXV. Atividade residual da tripsina ou da quimotripsina, após pré-incubação de uma das enzimas com diferentes quantidades de IG-50.

Experiência realizada	Atividade residual (A_{280nm})	
	Tripsina	Quimotripsina
Tripsina (50 μ g), sem inibidor	0,825	
Tripsina (50 μ g) + inibidor(50 μ g)	0,006	
Quimotripsina (50 μ g) + inibidor (150 μ g) + Tripsina (50 μ g) ^a	0,010	0,010
Quimotripsina (50 μ g) + inibidor (100 μ g) + Tripsina (100 μ g) ^a	0,008	0,109
Quimotripsina (50 μ g) + inibidor (100 μ g) + Tripsina (150 μ g) ^a	0,670	0,107
Quimotripsina (50 μ g) + inibidor (200 μ g) + Tripsina (50 μ g) ^a	0,003	0,003
Quimotripsina (50 μ g), sem inibidor		0,705
Tripsina (50 μ g) + inibidor(50 μ g) + Quimotripsina (50 μ g) ^a	0,007	0,406
Quimotripsina (50 μ g) + inibidor (100 μ g)		0,095
Quimotripsina (50 μ g) + inibidor (150 μ g)		0,005
Tripsina (50 μ g) + inibidor(150 μ g) + Quimotripsina (50 μ g) ^a	0,000	0,013

^a O tratamento com a segunda enzima foi feito sempre após 20 min de incubação com a primeira enzima.

Quadro XXVI. Atividade das tripsinas humana e bovina sobre caseína e atividade inibidora sobre essas enzimas.

Determinações	Tripsina Humana	Tripsina Bovina
Atividade enzimática (U/mg material) ^a	64	1.894
Atividade inibidora (UEI/mg inibidor) ^b	18.485	5.116

^a Relação de atividade: tripsina bovina/tripsina humana = 29,6

^b Relação de inibição: tripsina humana/tripsina bovina = 3,6

Na figura 24 está representado, graficamente, o comportamento cinético dos inibidores (IG-50) contra a tripsina, quando se usou o substrato sintético benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA). A figura 24 foi construída com os dados de velocidade da reação em função da concentração do substrato, na ausência e na presença dos inibidores, utilizando o método de Lineweaver e Burk (1934). Torna-se aparente pela análise desse gráfico que a inibição da tripsina pelos inibidores (IG-50) não seguiu uma cinética simples do tipo competitivo ou não competitivo. É um tipo de inibição que, segundo Webb (1963) poderia ser chamada de inibição mista. A constante de Michaelis (K_M) determinada a partir desses experimentos com BAPNA foi $6,9 \times 10^{-4}M$, e a constante de dissociação do complexo enzima-inibidor (K_i), para a tripsina foi de $5,4 \times 10^{-8}M$. O valor K_i é uma constante que representa a concentração de inibidor, capaz de duplicar a inclinação da reta do gráfico ($1/v \times 1/s$) ou o valor de intersecção da reta experimental com a ordenada. Quando se usou caseína como substrato tanto para a tripsina como para a quimotripsina a inibição foi, aparentemente, do tipo não competitivo.

O Quadro XXVII, mostra os parâmetros moleculares e as constantes físico-químicas determinadas para os inibidores em IG-50, direta ou indiretamente.

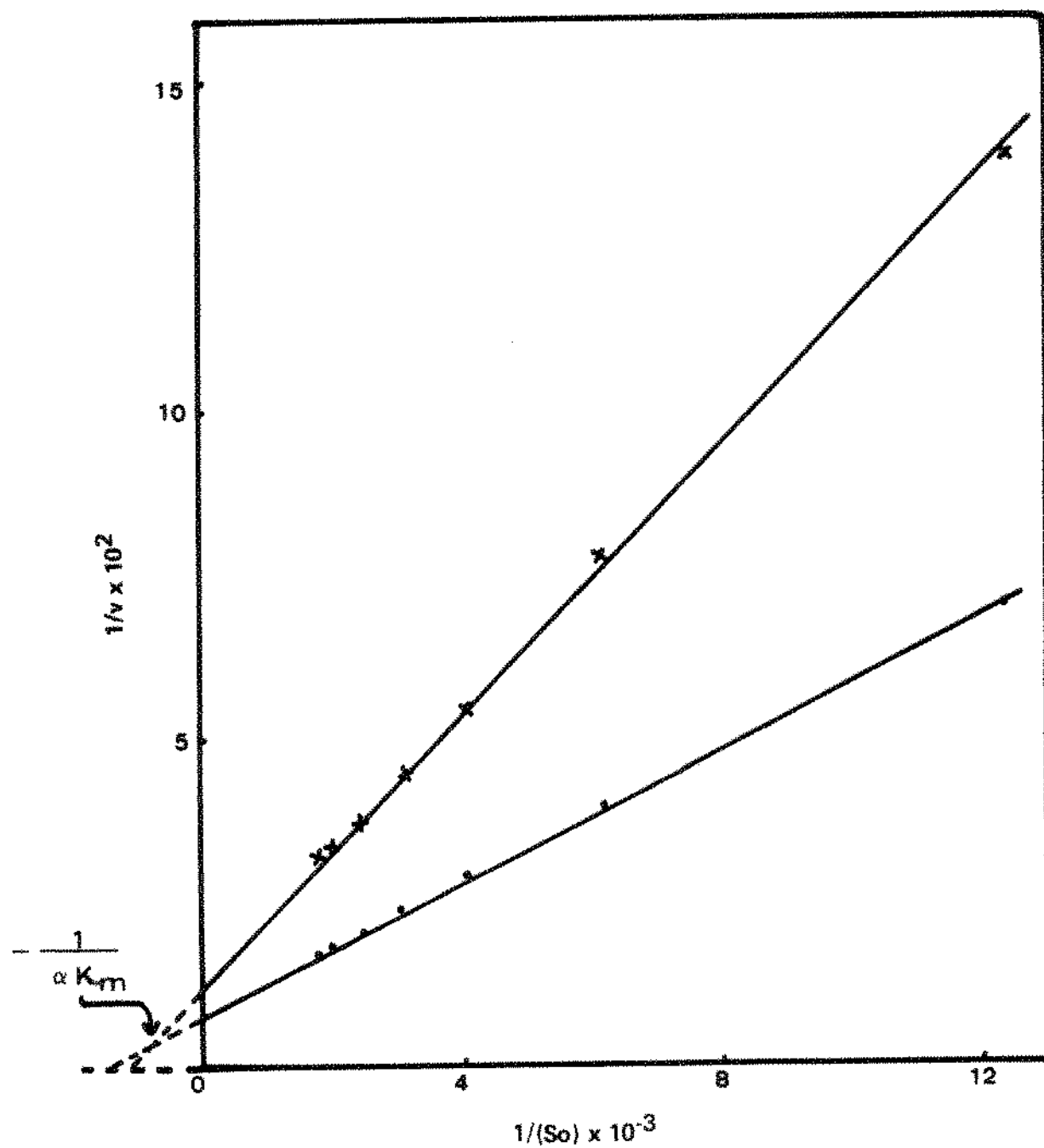


Fig. 24. Representação gráfica segundo Lineweaver-Burk, da ação da tripsina sobre o substrato benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA). Na ausência de inibidor, ●—●; na presença de inibidor, x—x—x.

Quadro XXVII. Parâmetros moleculares e constantes físico-químicas determinadas para os inibidores (IG-50).

Parâmetro determinado	Valor Encontrado
Peso molecular (daltons)	$2,0 \times 10^4$
Constante de sedimentação (S)	$2,0 \pm 0,2$
Constante de difusão, D ($\text{cm}^2 \cdot \text{seg}^{-1}$)	$10,7 \times 10^{-7}$
Volume específico parcial, $\bar{v}$ ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	0,69
Raio molecular de Stokes, a_s (Å)	20
Quociente friccional, f/f_0	1,14
Absortividade, a ($\text{mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	0,400
Absortividade molar, ϵ ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	$8,0 \times 10^3$
pH isoelétrico (PI)	5,0; 6,1
KM, pepsina, BAPNA (M)	$6,9 \times 10^{-4}$
Ki, pepsina, BAPNA (M)	$5,4 \times 10^{-8}$
1/2 cistina (g/100g proteína)	11,4
1/2 cistina (moles/20.000g)	18,0
Pontes dissulfídicas (-S-S-/mol)	9
Triptofânio (moles/20.000g)	0,0

PROPRIEDADES NUTRICIONAIS DAS PROTEÍNAS DO FEIJÃO ROSINHA G2

As composições centesimais da farinha integral, das principais frações protéicas isoladas e do resíduo insolúvel, após extração das proteínas, aparecem no Quadro XXVIII. Deve-se notar o teor bem mais elevado de proteína na fração globulina comparado com o isolado total e, principalmente, com a albumina. A extração da farinha integral com água e depois com solução 0,5M de NaCl, usando-se uma relação sólido/líquido 1:5 nas duas extrações, extraiu de 45 a 50% dos sólidos totais, deixando um resíduo que contém cerca de 25% das proteínas da farinha. A presença de concentração relativamente alta de sais nas proteínas extraídas, após diálise e liofilização, se deve, provavelmente, à incompleta eliminação dos mesmos com a diálise contra água destilada por 48 a 72 horas.

A julgar pelos valores de PER do Quadro XXIX, podemos concluir que o valor nutritivo das proteínas dessa variedade de feijão é bastante baixo, tanto na farinha integral como nas frações protéicas isoladas ou nos sólidos insolúveis resultantes da extração das proteínas. Comparados com o da caseína, esses valores representam cerca de 15% apenas no caso da albumina e 34% no caso da farinha integral. Das frações protéicas isoladas, a globulina foi a que apresentou PER mais elevado (0,98).

O baixo quociente de eficiência protéica das proteínas de feijão se deve, principalmente, à deficiência de aminoácidos sulfurados, particularmente metionina.

Os dados do Quadro XXIX mostram também o efeito produ

zido no PER pela adição de 3% de DL-metionina e 2% de L-cisteína em relação à concentração de proteínas das dietas. Observou-se que o efeito dessa adição foi bem maior nas proteínas isoladas, vindo em seguida o resíduo insolúvel e por último a farinha integral. A adição de metionina e cisteína às proteínas isoladas de feijão elevou o PER para valores superiores ao da caseína, enquanto que a adição da mesma quantidade de aminoácidos sulfurados à farinha integral elevou o PER de 1,17 a 2,47, valor bem inferior ao da caseína (3,46). Esses resultados sugerem a existência de uma ou mais substâncias na farinha integral que estaria interferindo com a eficiência de utilização da proteína ou com a utilização eficiente dos aminoácidos sulfurados adicionados às dietas. O efeito da adição de metionina e cisteína à dieta, contendo os sólidos insolúveis (resíduo) como fonte de proteína, foi intermediário entre o das proteínas isoladas e o da farinha integral. A elevação do PER foi de 0,87 para 3,27, portanto, bem próximo do valor encontrado para a caseína.

Nesse ensaio de PER houve, novamente, uma tendência da fração globulina apresentar melhores índices que os da albumina e os do isolado protéico total, tanto com adição dos aminoácidos sulfurados como sem adição.

Os valores de digestibilidade, de retenção de nitrogênio e de valor biológico das proteínas do feijão Rosinha G2 e os da caseína, foram determinados em um ensaio de balanço de nitrogênio em ratos e aparecem no Quadro XXX. São notáveis as diferenças de retenções de nitrogênio, pelos animais, entre as

dietas com caseína e com proteínas de feijão. A fração albumina foi a que promoveu a menor retenção de nitrogênio (11,2mg/rato/24h). Quanto à digestibilidade aparente, a fração globulina foi a que apresentou porcentagem mais alta, 83,3%, seguido do isolado protéico total e da albumina, 73 e 72%, respectivamente, enquanto que, a proteína da farinha integral foi apenas 59% digerível. Todos esses valores podem ser considerados bastante baixos em relação à digestibilidade da caseína que foi de 94%.

Diferenças ainda maiores foram verificadas em relação ao valor biológico que foi de 84% para a caseína e 32,7 , 29,4, 30,3 e 28% para as proteínas da farinha integral, do isolado protéico total, da fração globulina e da albumina, respectivamente.

O baixo valor nutritivo das proteínas dessa variedade de feijão foi surpreendentemente melhorado pela adição de metionina e cisteína em quantidades suficientes para garantir um ôtimo crescimento para o rato. Essa resposta tão favorável à adição de aminoácidos sulfurados sugeriu uma reduzida disponibilidade biológica desses aminoácidos nas proteínas de feijão.

Um ensaio de disponibilidade biológica da metionina, feito com ratos em crescimento, permitiu a determinação das porcentagens de disponibilidade apresentadas no Quadro XXXI. O valor mais alto encontrado foi de 51% para a fração globulina, seguido de 46% na farinha integral, 34% no isolado protéico total e 5,8 e 4,6% para a albumina e o resíduo insolúvel, respectivamente. É bastante significativo o fato de que a fração albumina, apesar de conter 1,71g de metionina por 16g de nitrogê

nio (Quadro VII), apresentou uma disponibilidade biológica praticamente nula para esse aminoácido. O mesmo se verificou com relação às proteínas contidas no resíduo que continham 1,23g de metionina por 16g de nitrogênio (Quadro VIII) quase que totalmente não disponível.

A importância relativa da incorporação às dietas com 10% de caseína, dos inibidores de tripsina e de quimotripsina ou da hemaglutinina, purificados a partir da fração albumina do feijão Rosinha G2, foi estudada em dois experimentos de balanço de nitrogênio, cujos dados são apresentados no Quadro XXXII. Nos experimentos A e B, os grupos GI foram alimentados com dieta contendo 10% de caseína, enquanto que os grupos GII receberam, no experimento A, uma dieta com 10% de caseína mais 0,5% de hemaglutinina purificada e no experimento B, uma dieta com 10% de caseína mais 1% de inibidores purificados (IG-50).

Os dados do experimento A, revelaram que a adição de hemaglutinina (0,5% da dieta) baixou a digestibilidade da caseína para 93% do controle, afetando também o valor biológico aparente e o crescimento que foram de 88,7 e 64,7%, respectivamente, em relação aos da caseína na ausência da hemaglutinina.

No experimento B, a presença de 1% de inibidor na dieta com 10% de caseína, aparentemente, não afetou em nada esses parâmetros nutricionais assim como o ganho de peso pelos animais.

A inocuidade dos inibidores (IG-50) como fator de toxicidade, em experimentos de curta duração, foi também evidenciada

na determinação do NPU para uma dieta com 5% de caseína sem ini
bidor e contendo 3% de inibidor em relação à concentração de
proteína. Os valores encontrados foram 81,5 e 83,9% para o NPU
da caseína, respectivamente, na ausência e na presença dos ini
bidores.

Quadro XXVIII. Composição centesimal da farinha integral e de algumas frações protéicas de feijão Rosinha G2.

Material analisado	Água (%)	Proteína (%N x 6,25)	Lípide total ^b (%)	Fibra crua (%)	Cinza (%)	Carboidrato ^c (%)
Farinha integral	9,84	23,20	1,64	4,70	3,02	57,60
Isolado protéico total (IPT)	7,48	70,50	0,16	0,05	1,12	20,69
Albumina (F ₁)	9,00	63,94	0,07	0,00	1,04	25,95
Globulina (F ₃)	6,00	86,62	0,09	0,00	0,94	6,35
Resíduo insolúvel ^a	7,83	10,13	1,47	7,52	0,97	72,08

^a Resíduo insolúvel após extração da farinha com água e com solução 0,5M de NaCl (S/L, 1:5) em cada extração.

^b Sólidos determinados gravimetricamente no extrato etéreo, após evaporação completa do éter.

^c Calculado por diferença.

Quadro XXIX. Valores de PER encontrados para as proteínas da fa
rinha e de algumas frações protéicas de feijão Rosi
nha G2, com e sem adição de metionina.

Fonte protéica ^a	com adição de metionina e de cisteína ^c	sem adição de metionina e de cisteína
Farinha integral	2,47 $\pm$ 0,21	1,17 $\pm$ 0,24
Isolado protéico total (IPT)	4,00 $\pm$ 0,18	0,70 $\pm$ 0,28
Albumina (F ₁)	3,98 $\pm$ 0,37	0,50 $\pm$ 0,27
Globulina (F ₃)	4,47 $\pm$ 0,22	0,98 $\pm$ 0,31
Resíduo insolúvel ^b	3,27 $\pm$ 0,27	0,87 $\pm$ 0,19
Caseína		3,46 $\pm$ 0,31

^a Material foi autoclavado 15 min a 121°C e em seguida liofilizado
antes da incorporação às dietas.

^b Resíduo insolúvel após extração da farinha com água e com solução
0,5M de NaCl.

^c Adição de 3% de DL-metionina e 2% de L-cisteína em relação à
proteína da dieta.

Quadro XXX. Balanço de nitrogênio, valor biológico e digestibilidade aparentes, das proteínas da farinha integral e de frações protéicas isoladas de feijão Rosinha G2, comparados com a caseína.

Fonte protéica ^a	Balanço de nitrogênio ^b (mg N retido/24 h)	Digestibilidade aparente (%)	Valor Biológico aparente (%)
Farinha integral	19,8	59,0	32,7
Isolado protéico total (IPT)	17,2	73,0	29,4
Globulina (F ₃)	15,6	83,3	30,3
Albumina (F ₁)	11,2	72,0	28,0
Caseína	140,7	94,0	84,0

^a Amostras, exceto a caseína, foram previamente autoclavadas por 15 min a 121°C.

^b Todos os resultados deste Quadro foram calculados a partir do estudo de balanço de nitrogênio durante 96 horas e são as médias obtidas com 5 ratos.

Quadro XXXI. Disponibilidade biológica da metionina nas proteí
nas da farinha integral e de frações protéicas do
feijão Rosinha G2.

Fonte protéica ^a	Metionina disponível ^b (%)
Farinha integral	46,0
Isolado protéico total (IPT)	34,0
Globulina (F ₃)	51,0
Albumina (F ₁)	5,8
Resíduo insolúvel	4,6

^a Material previamente autoclavado por 15 min a 121°C.

^b Os resultados expressam as médias encontradas para 5 ratos.

Quadro XXXII. Influência da presença dos inibidores de tripsina e de quimotripsina ou de uma hemaglutinina isolada de feijão Rosinha G2 sobre as propriedades nutricionais da caseína.

Determinação ^a	Experimento A ^b		Experimento B ^c	
	GI	GII	GI	GII
Nitrogênio ingerido (mg)	177,5	113,8	156,1	180,9
Nitrogênio fecal (mg)	10,4	13,6	12,5	16,0
Nitrogênio urinário (mg)	26,4	25,4	23,2	29,8
Nitrogênio absorvido (mg)	167,1	100,2	143,6	164,9
Nitrogênio retido (mg)	140,7	74,8	120,3	134,9
Digestibilidade aparente (%)	94,1	88,0	92,3	91,5
Valor biológico aparente (%)	84,2	74,7	83,5	81,9
Ganho de peso (g)	3,0	2,0	3,6	3,7

^a Os valores, por rato e por 24h, são as médias de 5 ratos.

^b Experimento A: GI, 10% de caseína; GII, 10% de caseína + 0,5% de hemaglutinina^d.

^c Experimento B: GI, 10% de caseína; GII, 10% de caseína + 1% de inibidor (IG-50).

^d Hemaglutinina isolada por cromatografia de afinidade (Junqueira, 1979).

SOLUBILIDADE E EXTRATIBILIDADE DAS PROTEÍNAS DO FEIJÃO ROSI
NHA G2

As proteínas de origem vegetal são comumente classificadas em albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas, de acordo com a solubilidade em água, soluções salinas diluídas, álcool e soluções ácidas ou alcalinas diluídas, respectivamente.

As proteínas do feijão foram estudadas inicialmente por Osborne (1894), revelando que as proteínas extraíveis eram, principalmente, globulinas. Vários pesquisadores estudaram a extratibilidade e a solubilidade das proteínas de feijão, confirmando as observações iniciais de Osborne de que 70 a 80% das proteínas do grão são extraíveis em soluções de cloreto de sódio. A porcentagem de extração do nitrogênio total do grão varia bastante em função da espécie ou variedade e das condições de extração, sendo evidente que todos os fatores que influem na solubilidade de proteínas afetam a porcentagem de extração (temperatura, tipo de solvente, relação sólido/solvente, granulometria dos sólidos, e pH do solvente). Com solução 0,5M de NaCl, Smith e col. (1959) extraíram 76,2% do nitrogênio de "Kidney Bean" com uma única extração. Por outro lado Ishino e Ortega (1975), efetuando uma extração em cinco etapas, conseguiram extrair 88,4% do nitrogênio total do grão de feijão "Negro Mecntral" (*Phaseolus vulgaris*).

No presente estudo, quando foi feita uma primeira extração com água seguido de uma re-extração do resíduo com solução 0,5M de NaCl, extraiu-se 82% da proteína da farinha integral de feijão Rosinha G2. A porcentagem de extração não foi afetada, significativamente, ao se alterar a relação sólido/líquido de 1:5 para 1:20 (Quadro III). Uma série de extrações fracionadas da mesma farinha com diferentes solventes permitiu uma extração de 93% do nitrogênio total do grão de feijão Rosinha G2. Desse total, 48% foi extraído em uma única extração com água destilada (S/L 1:5), 25,6% com solução 0,5M de NaCl e, 19,3% com tampão borato de sódio pH 10,0 contendo 0,5% de 2-mercaptoetanol e 0,5% de lauril sulfato de sódio (Quadro III). As proteínas extraídas com este último solvente devem representar principalmente glutelinas e algumas proteínas ligadas ao material insolúvel do grão por ligações não covalentes. Os 7% restantes do nitrogênio total, permanecem fortemente ligados ao resíduo insolúvel, devendo ser constituído por proteínas estruturais, bem como, por algumas proteínas ligadas aos sólidos insolúveis por ligações covalentes. Essas porcentagens de extração coincidiram, em linhas gerais, com os dados de Pant e Tulsiani (1969) para três variedades de *Phaseolus*.

A solubilidade das proteínas de *Phaseolus*, em função do pH, tem sido estudada por vários pesquisadores (Satterlee e col. 1975; Pant e Tulsiani 1969; Ishino e Ortega, 1975). O pH de menor solubilidade variou entre 2,0 - 4,0, para os vários pesquisadores.

Para o feijão Rosinha G2 a solubilidade foi baixa (menor que 25%) entre os pH's 3 e 5,5, sendo mínima (aproximadamente 15%) em pH 4 (Fig. 3). A curva da figura 3 sugere a existência de proteínas nessa variedade com pontos isoelétricos em duas faixas de pH's diferentes, isto é, entre 3,5 - 4,5 e entre 4,5 - 5,5.

Outro fator que influíu decisivamente na extratibilidade e na solubilidade das proteínas de feijão foi o tratamento térmico prévio do grão. O Quadro V mostra que um extrato aquoso (S/L 1:50) continha 72% das proteínas do grão, com 5 minutos de aquecimento (97°C), 30% e com 15 minutos apenas 15%. A queda de solubilidade foi muito rápida nos primeiros 2 a 3 minutos de aquecimento, indicando que grande parte das proteínas desse feijão é bastante termolábil.

As diferenças de solubilidade dessas proteínas em função do pH, da concentração de sais (força iônica) e da coagulabilidade térmica constituiu-se na base para o fracionamento das proteínas a partir de um extrato bruto. Para tanto empregaram-se acidificação de um extrato alcalino até o pH de menor solubilidade (P.I.); diminuição da força iônica de um extrato salino através da diálise, em água destilada ou em soluções tampões diluídas; aquecimento até coagulação e precipitação da fração proteica coagulada, por centrifugação.

Os extratos salinos (0,5M de NaCl) do feijão Rosinha G2, quando submetido à diálise em água destilada por 48h fornecia duas frações, uma insolúvel em água que era obtida como um

precipitado, após a diálise, e outra solúvel em água destilada. A fração que precipitava durante a diálise era referida como fração "globulina", a que permanecia em solução era denominada albumina. Contudo, a separação entre albuminas e globulinas não foi completa durante a diálise e o uso dos termos, albumina e globulina, para essas duas frações deve ser feito com a devida cautela.

Os perfis eletroforéticos apresentados na figura 6 mostraram que ocorreu uma contaminação cruzada das albuminas pelas globulinas e vice-versa durante a diálise. A probabilidade de co-precipitação de albuminas com as globulinas era aparentemente maior, à medida que a concentração de proteínas no extrato bruto era aumentada. Por outro lado, algumas globulinas ou pseudo-globulinas mostraram-se solúveis em água em diluições bastante elevadas (Sun e Hall, 1975).

A fração precipitada durante a diálise, quando re-extraída em solução salina da mesma concentração usada para obtenção do extrato bruto (0,5M de NaCl) não se apresentava totalmente solúvel, deixando um resíduo bastante pigmentado (fig. 2). As proteínas que compõem a fração solúvel em solução 0,5M de NaCl (F_3) eram essencialmente globulinas. As que compunham o resíduo insolúvel (F_4) pareciam ter sido insolubilizadas pela formação de complexos com vários tipos de compostos presentes no extrato bruto. Os componentes dessa fração não puderam ser separados na eletroforese, uma vez que a sua mobilidade eletroforética foi praticamente nula, impedindo a resolução dos seus

componentes. A fração solúvel em solução 0,5M de NaCl (globulina), quando dissolvida em tampão TRIS-glicina pH 8,2 e submetida à eletroforese, apresentava um número de bandas que variou entre seis e oito para a variedade estudada. O componente que se apresentava em maior concentração nessa fração tinha mobilidade relativa ao redor de 0,45 - 0,47, muito semelhante em mobilidade a duas bandas igualmente importantes das albuminas (MR 0,39; 0,46) que continham toda a atividade hemaglutinante da fração albumina.

A fração albumina (F_1) apresentou-se eletroforeticamente mais complexa que as demais, separando-se na eletroforese em gel de poliacrilamida em oito a dez bandas de proteínas de mobilidade entre 0,12 a 0,93. Essa fração continha maior atividade das proteínas denominadas antinutricionais representadas pelos inibidores de tripsina e de quimotripsina e pelas fito-hemaglutininas. A maior parte da atividade dessas proteínas permanecia na fração solúvel, quando o pH do extrato bruto era ajustado a um valor próximo do ponto isoelétrico da maioria das proteínas (pH de menor solubilidade). Cerca de 70% das proteínas extraídas do feijão Rosinha G2, em solução salina, precipitava pelo abaixamento do pH entre 3,8 e 4,0. Vários autores fizeram uso dessa propriedade no processo de isolamento e como etapa inicial de purificação dos inibidores de tripsina e de fito-hemaglutininas, assim como no isolamento de concentrados protéicos de baixa atividade antinutricional (Pusztai, 1966; Nowaková e Kocourek, 1974; Satterlee e col. 1975).

A relação entre globulinas e albuminas pode variar bastante entre espécies e variedades de leguminosas. Assim, Pant e Tulsiani (1969) resportaram uma relação de aproximadamente 9:1 entre globulina e albumina para três variedades de *Phaseolus* (Pink Rajmah, Red Rajmah e Bakla). Satterlee e col. (1975) determinaram uma relação globulina/albumina de 2:1 para a variedade "Great Northern". Ishino e Ortega (1975) encontraram a relação 3:1 na variedade "Negro Mecentral", o mesmo se verificando em Sun e Hall (1975) para a variedade "Tendergreen". Sgarbieri e col. (1978) determinaram em 60 variedades de *Phaseolus* uma relação globulina/albumina entre 1,0 e 3,5.

No presente trabalho a relação "globulina"/albumina , para a variedade Rosinha G2, variou nas diversas extrações entre 1,95 e 2,55, dependendo do tipo de solvente e da relação S/L empregados (Quadros III e IV).

A importância dessa relação para as proteínas de *Phaseolus* será discutida posteriormente em conexão com o valor nutritivo dessas proteínas.

Outra propriedade geral das proteínas de *Phaseolus*, que poderá ser explorada durante isolamento e purificação de alguma proteína específica, é a diferença de resistência térmica apresentada pelas diversas proteínas. A coagulação térmica das proteínas no extrato de feijão Rosinha G2 se inicia a partir de 60°C. Tratamento a 97°C, durante 15 minutos, coagulava cerca de 80% das proteínas do extrato bruto e, aproximadamente, 70% das albuminas, quando essa fração foi aquecida separadamen

te. A coagulabilidade de mais de 2/3 das albuminas, sem contudo afetar a atividade do inibidor de tripsina e de quimotripsina, foi utilizada nesta pesquisa como ponto de partida para a purificação do inibidor. Esse procedimento apresentou, também, a vantagem de se poder obter quantidades consideráveis de albuminas não coaguláveis, contendo, praticamente, toda a atividade inibidora para tripsina e quimotripsina, porém, isenta do fator hemaglutinante, que sendo mais termolábil que os inibidores, sofre desnaturação térmica e coagulação.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS INIBIDORES DE TRIPSINA E DE QUIMOTRIPSINA

O peso molecular de 20.000 ± 1.000 foi determinado para os inibidores isolados do feijão Rosinha G2 por três métodos físico-químicos diferentes, isto é, ultrafiltração em gradiente de densidade (5 - 20% de sacarose), eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e ultrafiltração em coluna de Sephadex G-100. Esse peso molecular foi também confirmado pela composição de aminoácido (Quadro XIV). A maioria dos inibidores de *Phaseolus* isolados e purificados até o presente possui peso molecular ao redor de 10.000, exceto o de "Navy Bean" que apresentou peso molecular 23.000 (Quadro I). Na soja o chamado inibidor de Bowman-Birk tem sido isolado com peso molecular variando entre 8.000 e 27.000. Segundo Birk (1968), esse inibidor aparece formando dímeros e trímeros, graças à sua propriedade de associação e dissociação de seus polipeptídeos. O próprio Birk

admite a possibilidade de que os inibidores de tripsina e de quimotripsina encontrados em *Phaseolus* com peso molecular de 20.000 pudessem ser dímeros do polipeptídeo básico de peso molecular 10.000. Estariam nessa categoria os inibidores de "Navy Bean" e os inibidores do feijão Rosinha G2, objeto do presente estudo e que apresentaram peso molecular 20.000. Contudo, incubação com mercaptoetanol e eletroforese em gel, contendo SDS, forneceu apenas uma banda de proteína para o IG-50, o que se apresenta como forte evidência de que os inibidores isolados da fração albumina do feijão Rosinha G2 são formados de polipeptídeos de peso molecular 20.000. Em sua composição de aminoácidos, observou-se uma notável predominância de serina, 1/2 cistina e treonina, além dos aminoácidos aspártico e glutâmico. Em contraposição, encontraram-se teores muito baixos de valina, metionina, leucina e dos aminoácidos aromáticos, destacando-se a completa ausência do triptofânio e de cisteína. Essas características parecem ser comuns a todos os inibidores isolados de *Phaseolus*, embora com notáveis variações entre as diversas espécies e variedades. Os inibidores isolados do feijão Rosinha G2 se assemelham muito ao do "Kidney Bean", Pusztai (1966), no tocante aos teores de treonina, serina, prolina, 1/2 cistina, leucina e valina em suas moléculas. Diferem do inibidor de "Kidney Bean" por não conter triptofânio e apresentar carboidrato na molécula. Embora se assemelhem ao inibidor de "Navy Bean" quanto aos teores de treonina, serina, valina, leucina e dos aminoácidos aromáticos, inclusive pela ausência do triptofânio, diferem por

apresentar um teor bem mais baixo dos aminoácidos prolina e 1/2 cistina (Wagner e Riehm, 1967). O inibidor de "Navy Bean" continha 2 moles de manose por mol (23.000g) de proteína, enquanto que os inibidores de Rosinha G2 continham 3,75% de carboidrato total distribuído entre manose, xilose e glicosamina. O inibidor de "Navy Bean" é o único inibidor, dentre os que haviam sido isolados até o presente de espécies do gênero *Phaseolus*, que revelou a presença de carboidrato na sua estrutura.

Outra característica estrutural importante dos inibidores isolados do feijão Rosinha G2 foi a completa ausência de grupos sulfidrilos livres em suas moléculas, apesar do elevado teor de 1/2 cistina, o que sugere a existência de elevado número de ligações dissulfídicas. A inativação dos inibidores, pela oxidação ou redução dos grupos dissulfídicos, evidencia a importância dessas ligações e da cistina na manutenção da estrutura terciária e da conformação de seus sítios ativos.

Foram determinados, também, vários parâmetros moleculares para os inibidores isolados do feijão Rosinha G2, dentre os quais o volume específico parcial, o coeficiente de difusão, o raio molecular de Stokes e o quociente friccional (Quadro XXVII). Os volumes específicos parciais ($\bar{V}$) para os inibidores de *Phaseolus* descritos na literatura variam entre 0,68 e 0,74 (Quadro I). Com base na composição de aminoácidos foi determinado, para os inibidores (IG-50) isolado do feijão Rosinha G2, um volume específico parcial de 0,69, que coincide com o valor encontrado para o de "Navy Bean". O coeficiente de difusão

($D = 10,7 \times 10^{-7}$) é da mesma ordem de grandeza dos valores encontrados para outros inibidores como, por exemplo, o de Bowman-Birk, $9,03 \times 10^{-7}$ (Kassell, 1970). O raio molecular de Stokes de 20 Å, encontrado para os inibidores de feijão Rosinha G2 (PM 20.000), está em perfeita concordância com o dos inibidores de "Lima Bean" que é de 11 Å, apresentando peso molecular 9.000. A julgar pelo quociente friccional $f/f_0 = 1,14$, encontrado para os inibidores isolados do feijão Rosinha G2, poder-se-ia admitir qualquer combinação de hidratação e assimetria para as moléculas dentro dos limites de 0,4g de água por grama de proteína e uma relação axial máxima $a/b = 4$ (Springall, 1954). Como, em média, o grau de hidratação das proteínas é de 0,3g de água por grama, e, baseado nos dados de volume específico parcial (0,69) e no elevado número de pontes dissulfídicas (≥ 9), o que indicaria uma estrutura bastante dobrada e compacta, nos parece razoável especular que as moléculas desses inibidores, em solução, poderia adquirir uma conformação que se aproximaria bastante à da esfera. Contudo, a previsão do comportamento hidrodinâmico de uma proteína, em solução, é um problema extremamente complexo, envolvendo o emprego de cálculos e modelos aproximados com prejuízo, muitas vezes, da exatidão na determinação dos parâmetros.

A composição e, provavelmente, a configuração compacta que se originaria como consequência do elevado número de pontes dissulfídicas nas moléculas, seriam os responsáveis pela resistência oferecida pelos inibidores à desnaturação, tanto térmica

como pela uréia e, também, pela ação da pepsina sendo, entretanto, bastante lábil aos reagentes de grupos dissulfídicos.

Incubação com solução 8M de uréia a 50°C durante 4h, destruiu apenas cerca de 30% da atividade inibidora, o que revelou a pequena importância e a não essencialidade das pontes de hidrogênio para a manutenção da conformação natural dos centros ativos dos inibidores (Quadro XIX). Já, o mercaptoetanol na concentração 0,2M, eliminou 70% da atividade inibidora, quando incubados 2h a 37°C. Incubação em solução 0,2M de ditiotreitol por 30 min a 25°C, eliminou apenas 46% da atividade dos inibidores. Porém, quando a incubação foi feita pelo mesmo tempo a 97°C, a inativação foi completa a uma concentração de apenas 0,81mM de ditiotreitol.

Essas experiências sugeriram que as ligações dissulfídicas são importantes para a manutenção da conformação ativa dos inibidores e que, a redução total e irreversível dessas ligações produzia a sua completa inativação.

A resistência térmica dos inibidores isolados do feijão Rosinha G2 foi surpreendente. Duas horas de aquecimento de uma solução (1mg/ml) de inibidor a 97°C não destruíram praticamente nada de sua atividade. Aquecimento da solução aquosa, até 60 min em água em ebulição, provocou uma ativação dos inibidores (Fig. 18). Contudo, foi interessante a observação de que o aquecimento do grão de feijão por apenas 3 - 4 min em água fervente (97°C) foi suficiente para sua completa inativação (Quadro V). A única possível explicação para esse fato seria de que os inibidores, nos tecidos, estariam próximo e em condi-

ções de reagir com algum componente do tecido que, estimulado pelo calor formaria complexos insolúveis e inativos. Dessa forma, após 4 min de aquecimento do grão a 97°C, os inibidores não seriam mais extraídos em solução aquosa pela homogeneização dos grãos e centrifugação. Mesmo no homogenado integral não foi detectada nenhuma atividade inibidora em grãos aquecidos por 4 min ou mais, indicando que havia completa inativação. Essa inativação não deve ter ocorrido, todavia, pela desnaturação térmica das moléculas dos inibidores e sim, por algum tipo de complexação destes com algum outro constituinte do grão.

Em solução aquosa a pH 3,8, o tratamento térmico a 130°C, durante 180 min, inativou cerca de 80% da atividade inicial (Quadro XVII). Por outro lado, quando a solução foi aquecida à mesma temperatura, porém a pH 7,0, a inativação foi completa em 60 minutos. A maior efetividade do tratamento térmico, em pH mais alcalino se deve, provavelmente, à instabilização das ligações dissulfídicas com a elevação do pH. Os inibidores apresentaram predominância de grupos ácidos nas moléculas, podendo-se assumir, portanto, que a sua estabilidade deverá ser maior em meio ácido. Essa poderia ser também a explicação para o fato de que os inibidores isolados de *Phaseolus*, inclusive os de feijão Rosinha G2, isolados e purificados no presente trabalho, são resistentes à desnaturação em meio ácido e não sofrem ataque pela pepsina, nas condições ácidas do estômago.

Devido a predominância de grupos ácidos na molécula e ao elevado teor de pontes dissulfídicas, esses inibidores não sofrem, provavelmente, mudanças conformacionais em pH's baixos,

fazendo com que as ligações peptídicas se tornem inacessíveis à pepsina. Parecem ser resistentes também à ação da papaína (Birk, 1968). Ao contrário dos inibidores isolados de *Phaseolus* e do inibidor de Bowman-Birk extraído da soja, o inibidor de Kunitz (soja) e o inibidor da quimotripsina isolado da batata doce são hidrolisados pela pepsina em pH's ácidos. Esses inibidores possuem, em comum, um teor bem mais baixo de 1/2 cistina e de grupos ácidos na molécula, o que lhes conferiria a propriedade de sofrer alterações conformacionais e desnaturação parcial em meio ácido, de maneira a expor as ligações peptídicas à ação da pepsina.

Outro aspecto de considerável interesse em relação aos inibidores encontrados em *Phaseolus* se refere à especificidade e ao tipo de interação desses inibidores com as enzimas que eles inativam. Alguns inibem a tripsina, mas não a quimotripsina; outros, ao contrário, inibem a quimotripsina e não a tripsina. Certos inibidores inibem tanto a tripsina como a quimotripsina de maneira competitiva, possuindo um mesmo centro de ligação para as duas enzimas. Inibidores existem, ainda, que inibem tripsina e quimotripsina de maneira independente, possuindo, em suas moléculas, centros de ligação separados e independentes para a tripsina e para a quimotripsina (double headed).

Os dados de inibição fornecidos no Quadro XXV para os inibidores isolados do feijão Rosinha G2 durante esta pesquisa, parecem indicar que esses inibidores possui em suas moléculas, centros de ligação independentes, para a tripsina e para

a quimotripsina.

De acordo com Means e col. (1974) a interação da tripsina e da quimotripsina com os inibidores seria do mesmo tipo da que ocorre entre essas enzimas e os seus substratos naturais, uma vez que, a capacidade de combinação dos inibidores com a tripsina é eliminada pela modificação dos resíduos de lisina e de arginina em suas moléculas. A inativação da tripsina por esses inibidores é muito rápida em pH 8 e muito mais lenta em pH's abaixo de 6,0. Entre pH's 3-3,75, certas ligações peptídicas nas moléculas dos inibidores poderão ser, seletivamente, hidrolisadas pela tripsina ou pela quimotripsina.

Belitz e Fuchs (1973) e Weder (1973) conseguiram isolar do inibidor (PVI_3) de *Phaseolus vulgaris* var. nanus, após incubação a pH 3,2 com tripsina ou com quimotripsina, fragmentos ativos que revelaram a existência de centros de ligação independentes para a tripsina e para a quimotripsina. A ação da tripsina provocou no inibidor a hidrólise da ligação (-Lis²³-Ser²⁴-) liberando um polipeptídeo que continha a extremidade C-terminal da cadeia e que representava 75% de toda a molécula. Esse fragmento exibia a mesma atividade que o inibidor original contra a quimotripsina, possuindo, portanto, o centro de ligação para a quimotripsina. Por outro lado, a incubação do inibidor PVI_3 com a quimotripsina resultou na hidrólise da ligação (-Fen⁵²-Ser⁵³-), liberando um fragmento N-terminal com aproximadamente o mesmo tamanho que o anterior e que continha o centro de ligação para a tripsina. Essa foi a comprovação direta e de

finitiva da existência de centros de ligação independentes para a tripsina e para a quimotripsina nas moléculas desses inibidores.

Um fato de considerável interesse dos nutricionistas é o de saber se a tripsina humana é inibida, na mesma proporção que a tripsina bovina, pelos inibidores oriundos de diferentes fontes. Feeney e col. (1969) estudaram, comparativamente, a atividade de 16 inibidores de tripsina bovina também sobre a tripsina humana. Dos 16 inibidores apenas três, o do colostro bovino, o do pâncreas bovino, e o do feijão "Lima Bean", apresentaram forte atividade inibidora da tripsina humana. Os inibidores dos feijões "Navy Bean" e "Kidney Bean", assim como o ovomucóide de codorniz e os inibidores da soja, apresentaram baixa atividade e todos os demais não apresentaram nenhuma atividade sobre essa enzima.

Os inibidores isolados no presente estudo, do feijão Rosinha G2, foram 3,6 vezes mais efetivo na inativação da tripsina humana que da tripsina bovina, embora, a atividade específica sobre a tripsina bovina tivesse sido bastante alta. Nesse aspecto, os inibidores isolados de feijão Rosinha G2 assemelham-se mais aos inibidores encontrados no feijão "Lima Bean" e ao extraído de pâncreas bovino.

Um aspecto bastante controvertido e, portanto, ainda não esclarecido em relação a esses inibidores, diz respeito ao mecanismo, à cinética e ao tipo de inibição para os vários inibidores. Em relação ao tipo de inibição descrita para inibidores de origens diferentes, Kassell (1970), reportou: a) o inibi

dor de pâncreas bovino inibe a tripsina estequiometricamente e a inibição foi considerada competitiva ou pseudo não competitiva; b) para o inibidor de Kunitz (soja), a inibição da tripsina foi estequiométrica e considerada competitiva; c) o inibidor de Bowman-Birk (soja) inibiu a tripsina e a quimotripsina de maneira não competitiva e não estequiométrica; d) para os inibidores encontrados na clara de ovo de galinha, o ovomucóide inibiu a tripsina de maneira não competitiva, enquanto que para o ovoínbido, a inibição parece estar entre competitiva e não competitiva.

Fraenkel-Conrat e col. (1949) encontraram que acetilação de 70% dos grupos aminados da tripsina não destruía a atividade da enzima, porém, reduzia consideravelmente o poder de inativação da enzima pelo inibidor da clara de ovo (ovomucóide), de onde concluíram que certos grupos amínicos da molécula da tripsina eram importantes para a interação do inibidor com a enzima. Concluíram, também, de seus estudos cinéticos, que a inibição era do tipo não competitivo. Borchers e col. (1947) sugeriram que a inibição da tripsina pelo inibidor de Kunitz (soja) era não competitiva, enquanto que Green e Work (1953) chegaram à mesma conclusão para o inibidor extraído de pâncreas bovino.

Green (1953) com base em um estudo de competição de alguns compostos como diisopropil fluorofosfato (DFP), cloreto de mercúrio e o substrato para a tripsina benzoil-L-arginina etil éster (BAEE), com alguns inibidores da tripsina (ovomucóide, Kunitz, pâncreas bovino) concluiu que a inibição deveria ser do

tipo competitivo e que a cinética de Lineweaver-Burk não deve ria ser aplicada para esses inibidores.

Para os inibidores isolados por nós do feijão Rosinha G2, a inibição sobre tripsina, usando benzoil-DL-arginina-p-ni troanilida (BAPNA) como substrato, foi do tipo misto (Fig. 25), de acordo com Webb (1963). Quando caseína foi usada como subs trato a inibição, tanto para tripsina como para quimotripsina , foi do tipo não competitivo pelo método de Lineweaver-Burk (1934).

Para Green (1953) o inibidor teria pelo menos um ponto de interação com o centro ativo da enzima e as interações do inibidor com a tripsina seriam, principalmente, do tipo eletros tático. Por outro lado Means e col. (1974) são de opinião que inibidor e tripsina formariam um complexo não covalente, em que o sítio ativo da enzima ficaria bloqueado por impedimento estérico, de tal forma a impossibilitar o acesso da enzima ao substrato. Segundo Baugh e Trowbridge (1972), a grande afinida de desses inibidores pela tripsina e vice-versa, seria o resul tado de muitas interações fracas do tipo hidrofóbica (Van der Waals) que expulsaria a água da área de contato das duas proteí nas.

Toda essa divergência, sobre o mecanismo e o tipo de inibição da tripsina por esses inibidores de natureza protéica, se deve à falta de conhecimentos detalhados sobre os centros ativos dos vários inibidores e, portanto, dos possíveis grupa mentos que reagem na formação do complexo enzimático-inibidor.

COMPOSIÇÃO E PROPRIEDADES NUTRICIONAIS DAS PROTEÍNAS DO FEIJÃO ROSINHA G2.

É fato bem conhecido dos pesquisadores que as proteínas das sementes de leguminosas, inclusive as do gênero *Phaseo*lus, possuem elevado teor de lisina e baixo teor dos aminoácidos sulfurados (cisteína, cistina e metionina). Essa característica pode ser confirmada pela observação da composição de aminoácidos da farinha e do resíduo insolúvel da extração das proteínas (Quadro VIII) para a variedade Rosinha G2. A soma dos aminoácidos sulfurados parece não atender às necessidades da pessoa adulta, alcançando, apenas, pouco mais que 50% das quantidades recomendadas para as crianças, ainda que esses aminoácidos estivessem totalmente disponíveis (FAO/WHO, 1973).

Outra característica interessante da composição das proteínas de *Phaseolus* é a presença de carboidrato nas moléculas de um grande número de proteínas, em proporções variáveis. Jaffé e Hannig (1965) identificaram e quantificaram ramnose, fucose, xilose, arabinose, manose (galactose + glicose) e glicosamina em várias frações protéicas obtidas de "Kidney Bean", sendo que fucose, xilose, manose, galactose e glicosamina estavam presentes na maioria delas. Jaffé (1962) havia já demonstrado a presença dos açúcares galactose, xilose e fucose, em uma glicoproteína extraída de "caraotas negras" (*Phaseolus vulga*ris). Algumas glicoproteínas foram posteriormente isoladas e purificadas, Pusztai (1966), Pusztai (1970). Apenas um inibidor de tripsina havia sido isolado de *Phaseolus*, contendo açúcares

em sua estrutura (Wagner e Riehm, 1967).

No presente trabalho foi também demonstrado a presença de carboidrato em todas as frações protéicas isoladas (Quadro VI) em várias proporções. A fração albumina (F_1) continha a maior proporção de carboidrato (27,7%). A precipitação dessa fração com TCA, seguido de lavagens do precipitado com vários solventes, indicou que a maior parte dos carboidratos não estava ligado às proteínas por ligações covalentes, permanecendo na solução de TCA, após a precipitação das proteínas. As albuminas precipitadas com TCA continham galactose, glicose, manose, arabinose e xilose, ligadas às cadeias peptídicas, aparentemente, por ligações covalentes.

Os inibidores de tripsina, isolados por nós do feijão Rosinha G2, continham 3,75% de carboidrato total nas moléculas, representado pela manose, xilose e glicosamina.

A proporção relativa entre albumina e globulina parece ter um significado nutricional importante em relação às proteínas de reserva dos grãos de leguminosas. Bajaj (1973) reportou sobre uma correlação altamente positiva ($r = 0,998$) encontrada entre valor nutritivo e teor de albumina no grão de 22 cultivares de ervilha (*Pisum sativum*). Esse estudo indicava que o maior valor nutritivo dos cultivares com teores mais elevados de albumina resultava da melhor composição de aminoácidos dessa fração, particularmente, dos teores mais elevados de cistina e de metionina.

Os resultados relatados nesta tese, para o feijão Rosinha G2, revelaram propriedades antagônicas às das proteínas

de ervilha, para as frações albumina e globulina. Em nosso estudo, a fração albumina revelou inferioridade em relação às globulinas para todos os índices nutricionais determinados, apesar de ter apresentado em sua composição teores bem mais elevados que as globulinas, em aminoácidos sulfurados e em triptofânio. Nossos resultados parecem indicar que, para as variedades de *Phaseolus*, a correlação entre valor nutritivo das proteínas e teor de albumina seria significativamente negativa.

Os resultados dos experimentos relatados nesta tese indicam, de maneira bastante convincente, que os principais fatores responsáveis pelo baixo teor nutricional das proteínas do Rosinha G2 são a baixa digestibilidade e, principalmente, a baixa disponibilidade biológica da metionina.

A digestibilidade das proteínas na farinha de feijão integral autoclavado (15 min, 121°C) é da ordem de 60%, portanto, muito baixa em relação à da caseína que foi de 94% (Quadro XXX). Nas frações protéicas isoladas a digestibilidade melhorou consideravelmente, tendo sido mais baixa (72%) para as albuminas e mais elevada (83%) para as globulinas. Essa melhora significativa da digestibilidade das proteínas, após a sua extração do grão, sugere que nos grãos, elas poderiam estar complexadas com algum outro tipo de composto, de maneira a formar complexos menos digeríveis e menos assimiláveis ou que tais complexos poderiam se formar durante a digestão, com o auxílio dos vários sucos digestivos. O isolamento das proteínas, ao mesmo tempo em que romperia certas ligações fracas que manteriam as proteínas complexadas com outros constituintes das células, produziria a

separação das proteínas de tais compostos, capazes de reagir, evitando assim a formação de complexos. O tipo de estrutura dessas proteínas, particularmente, o das albuminas com elevado número de grupos dissulfídicos nas moléculas e com forte tendência à associação, facilitaria a formação de complexos pouco favoráveis à proteólise pelas enzimas digestivas (Romero e Ryan, 1978). Os resultados aqui apresentados mostraram que reagentes ou condições capazes de romper as ligações dissulfídicas elevaram consideravelmente a proteólise tanto das albuminas como das globulinas (Quadro X). A presença de carboidrato, associado ou ligado covalentemente às proteínas poderia, também, influir no grau de proteólise e na digestibilidade dessas proteínas (Boonvisut e Whitaker, 1976).

Outro fator que poderia exercer interferência sobre a digestibilidade das proteínas de *Phaseolus* é a grande resistência que certas proteínas, ou frações protéicas, oferecem à desnaturação térmica. Já foi discutido em páginas anteriores a surpreendente resistência térmica dos inibidores de tripsina e de quimotripsina isolados por nós, do feijão Rosinha G2, bem como a de outros inibidores isolados de várias leguminosas e que também são termoresistentes. Nessa mesma categoria deve ser incluída a globulina E isolada por Seidl e col. (1969) do feijão "Kidney Bean" (*P. vulgaris*). Essa proteína, que representava cerca de 30% das proteínas totais extraídas desse feijão, era resistente à hidrólise, mesmo depois de aquecida 60 min a 100°C. Além da resistência à proteólise, essa globulina inativava uma série de enzimas proteolíticas, mesmo depois de coagulada pelo

calor.

A disponibilidade da metionina das proteínas do feijão Rosinha G2 foi de aproximadamente 45-50% na farinha integral autoclavada (15 min, 121°C). Nas frações isoladas a disponibilidade foi de 51% para as globulinas e, apenas, cerca de 6% para as albuminas. Essa disponibilidade, extremamente baixa da metionina na fração albumina, poderia ser, em parte, devida à ação do calor durante autoclavagem, uma vez que essa fração contém elevada proporção de carboidrato, que poderia reagir com a proteína.

Por outro lado, dieta contendo albumina aquecida 30 min a 97°C resultou em perda de peso dos ratos, e, a albumina crua era tóxica, causando a morte de todos os animais em um período de 6-10 dias (Antunes e Sgarbieri, 1979a). A disponibilidade da metionina foi ainda mais baixa nas proteínas que permaneceram no resíduo insolúvel, após extração das albuminas e globulinas. Nesse caso, a baixa disponibilidade poderia ser atribuída ao estado de complexação das proteínas com outros constituintes das células, uma vez que, boa parte dessas proteínas poderiam ser consideradas proteínas estruturais. As verdadeiras causas da baixa disponibilidade biológica da metionina nas proteínas de feijão e, principalmente, da grande diferença de disponibilidade nas várias frações protéicas, ainda não são conhecidas.

Os resultados do Quadro XXIX forneceram uma evidência muito boa de que o valor biológico das proteínas do feijão Ro

sinha G2 depende da concentração e da disponibilidade biológica da metionina. Quando as dietas, contendo farinha integral ou uma das frações protéicas do feijão Rosinha G2, foram complementadas com 3% de DL-metionina, na base protéica, o PER determinado melhorou surpreendentemente. Foi muito interessante a observação de que a melhoria do PER não foi a mesma para a dieta contendo a farinha integral ou uma das várias frações protéicas. Por exemplo, para a proteína da farinha integral o PER mudou de 1,17 para 2,47 com a adição da metionina, para a fração albumina de 0,5 para 3,98, para o isolado protéico total de 0,7 para 4,0, para a fração globulina de 0,98 para 4,47 e para a dieta, contendo o resíduo (sólidos insolúveis) da extração das proteínas, o PER mudou de 0,87 para 3,27. Esses valores deverão ser comparados com o PER da caseína que foi de 3,46. Deve-se observar que tanto a farinha integral como o resíduo insolúvel não responderam tão bem quanto as frações protéicas isoladas, à adição de metionina. Isto sugere a existência de algum tipo de substância na farinha integral e, possivelmente também, no resíduo insolúvel, que estaria interferindo com a utilização da metionina adicionada. Essa interferência poderia ser no sentido de diminuição da absorção ou da existência no feijão integral de algum fator termo-resistente que interferiria de alguma forma com a fisiologia normal do rato, retardando o seu crescimento.

Evans e Bandemer (1967) reportaram que a soja e o feijão "Navy Bean" continham os mesmos níveis de metionina e de

cistina, entretanto, a soja promovia um crescimento muito melhor que o feijão, quando ratos eram alimentados com dietas contendo o mesmo teor de proteína. Foi verificado ainda, Evans e col. (1974) que a soja requeria uma suplementação com metionina menor que o feijão "Navy Bean" para que o máximo de crescimento dos ratos fosse atingido. Verificaram também que o feijão parecia interferir negativamente com a utilização da metionina adicionada.

A hipótese de que a absorção da metionina livre (adicionada) estaria sendo prejudicada pelo feijão foi refutada por Evans e Bauer (1978) e por Antunes e col. (1979), através de estudos de balanço metabólico para a metionina. Evans e Bauer verificaram que a metionina adicionada ao feijão "Navy Bean" era integralmente absorvida pelo rato, enquanto que Antunes e colaboradores chegaram à mesma conclusão com a variedade Rosinha G2.

Evans e Bauer (1978) estudaram o valor nutritivo de várias frações protéicas e da farinha integral do feijão "Navy Bean" com e sem adição de metionina. Chegaram à conclusão que esse feijão, autoclavado ou aquecido em água fervente, continha uma substância dialisável, portanto, de baixo peso molecular que inibia parcialmente o crescimento do rato. A natureza química dessa substância não foi identificada. Segundo esses autores, a presença dessa substância no feijão autoclavado poderia ser a responsável pelo menor crescimento dos ratos nas dietas com 10% de proteína de feijão "Navy Bean" complementadas com 0,3%

de metionina, quando comparado com o crescimento obtido com a soja nas mesmas condições. É possível que essa seja também a explicação para a grande diferença encontrada por nós para o PER do feijão Rosinha G2 comparado com os encontrados para as frações protéicas isoladas, em dietas preparadas com o mesmo nível de proteína e complementadas com a mesma quantidade de DL-metionina e de L-cisteína.

Em nossas pesquisas incluímos também ensaios biológicos em que tanto os inibidores como uma hemaglutinina, isolados do feijão Rosinha G2, foram incorporados à dieta contendo caseína como fonte protéica (Quadro XXXII).

Dois ensaios foram realizados com adição dos inibidores. Um balanço de nitrogênio de oito dias, com dieta contendo 10% de caseína e 1% de inibidor. Realizou-se ainda um ensaio de NPU em que a concentração de caseína na dieta foi de 5%, com a adição de inibidor na base de 3% da proteína. Nos dois ensaios não foi notado nenhum efeito dos inibidores sobre os ganhos de peso pelos ratos ou sobre os índices de valor nutricional da caseína. Esses resultados foram um tanto inesperados em vista do grande número de trabalhos que aparecem na literatura, sugerindo um efeito dos inibidores de tripsina no sentido de retardar o crescimento de animais jovens e produzir hipertrofia do pâncreas em várias espécies (Rackis, 1965; Broth e col. 1960; Nesheim e col. 1960; Liener, 1979).

Após a descoberta de Osborne e Mendel (1917) de que a soja crua inibia o crescimento de ratos, a descoberta de Kunitz

(1945) do inibidor de tripsina na soja, outros pesquisadores, demonstraram a existência de inibidores de enzimas proteolíticas em um grande número de sementes de leguminosas. Os fenômenos de atraso do crescimento e o aumento do tamanho do pâncreas, observado em várias espécies de animais alimentados com soja e outras leguminosas cruas ou semi-cruas, passaram a ser atribuídos não somente a atividade anti-proteolítica desses inibidores, mas também a prováveis efeitos tóxicos específicos dos inibidores e de outras proteínas termolábeis do grão.

Liener (1951) demonstrou que embora uma preparação crua de inibidor de tripsina inibisse o crescimento de ratos, quando introduzida na dieta em baixa concentração, ou fosse letal, quando injetada em ratos e pintos em elevada concentração, as preparações do inibidor em sua forma cristalina se mostraram inócuas. Foi também demonstrado que a inativação de 95% da atividade do inibidor de tripsina não eliminava a inibição do crescimento causada pela preparação não purificada. Outras observações foram feitas, por outros pesquisadores, as quais sugeriram que a toxidez das preparações, contendo inibidor de tripsina, tornava-se cada vez menor à medida que o mesmo era isolado em estado quimicamente mais puro. Por outro lado, outras proteínas tóxicas foram descobertas e isoladas, a exemplo das hemaglutininas.

Embora esteja praticamente demonstrado que os inibidores de tripsina e de quimotripsina não afetam o crescimento de rato e, possivelmente, o de outros animais, ainda existe muita dúvida quanto à sua possível interferência sobre o funcionamen

to do pâncreas bem como sobre seu possível efeito no aumento do requerimento de metionina pelo organismo.

Vários pesquisadores demonstraram que, em ratos, a ingestão de soja crua, ou de inibidores de tripsina isolados da soja ou o ovomucóide de galinha (isolado da clara do ovo) eleva a produção de enzimas pancreáticas de 3-5 vezes (Lyman e Lepkovsky, 1957; Lyman e col. 1962). Nitsan e Alumot (1964) demonstraram que, em pintos, a ingestão de farinha de soja crua reduz inicialmente o nível intestinal de enzimas proteolíticas que, depois de certo tempo, aumenta muito acima do nível normal. Foi sugerido que esse grande aumento deveria ter ocorrido afim de compensar a inibição da tripsina intestinal, pelo inibidor.

Pesquisas mais recentes; Green e Lyman (1972), Lyman e col. (1974) e Schneeman e Lyman (1975) demonstraram que a presença de tripsina ou de quimotripsina no intestino delgado inibe a produção de enzimas pelo pâncreas. A renovação dessas enzimas, ou a complexação das mesmas com o inibidor específico, estimula o pâncreas a produzir mais enzima. Ficou também demonstrado, Schneeman e Lyman (1975) que a tripsina e a quimotripsina agem no sentido de inibir a produção da colecistoquinina (CCK) pela mucosa intestinal. A CCK é um hormônio estimulador da secreção pancreática. É produzido apenas no terço superior do intestino delgado e a inibição de sua produção, pela tripsina ou quimotripsina, requer que essas enzimas estejam com os seus centros ativos livres, isto é, que elas estejam em sua forma ativa. Portanto, o inibidor, combinando-se com a tripsina e

com a quimotripsina, elimina o efeito repressivo dessas enzimas sobre a produção de colecistoquinina, que passaria a ser produzida pelas células da mucosa duodenal, estimulando o pâncreas a produzir enzimas.

Outro efeito muito interessante atribuído à ação dos inibidores de tripsina é o de estimular a conversão da metionina em cistina. Carroll e col. (1953) verificaram que o intestino de ratos alimentados com farinha de soja crua continha proteínas com teor excessivamente elevado de cistina. Por outro lado, Kwong e Barnes (1963) verificaram em ratos alimentados com farinha de soja cozida à qual se adicionou o inibidor de tripsina cristalino, seguido, depois de 2 horas da adição de metionina- C^{14} por intubação diretamente no estômago, um aumento imediato na quantidade de $^{14}CO_2$ expirado, até um nível equivalente ao que se obtinha pela administração de soja crua e de metionina marcada. Na mesma linha de pesquisa, Barnes e Kwong (1965) alimentaram rato com uma dieta de caseína por duas semanas, após o que administraram o inibidor de tripsina por intubação diretamente no estômago e, 2 horas mais tarde, administraram metionina- S^{35} . Logo depois, os ratos foram sacrificados para a determinação de cistina livre e também cistina ligada às proteínas do pâncreas. Os resultados mostraram, claramente, um aumento muito maior no teor de cistina- S^{35} nas proteínas dos animais que foram intubados com o inibidor, quando comparados com os que recebem metionina marcada, porém, não o inibidor.

É muito difícil, portanto, avaliar pelo que existe até

o presente na literatura, o verdadeiro papel dos inibidores de tripsina e de quimotripsina em nutrição animal e humana. Alguns dados parecem indicar que, quando esses inibidores são administrados em suas formas quimicamente puras, não interferem com o crescimento normal de animais experimentais, pelo menos em ensaios de curta duração. O seu envolvimento com a hipertrofia ou hiperplasia do pâncreas ainda não pode ser contestado, uma vez que ficou demonstrado que a presença desses inibidores, na primeira porção do intestino delgado, desencadeia uma série de processos fisiológicos que irão estimular o pâncreas a produzir uma quantidade várias vezes superior de enzimas, à que ele produz na ausência de inibidor. Esse mecanismo não só poderia resultar no aumento do pâncreas pela sua super-atividade como também, poderia causar uma perda exagerada de proteínas endógenas de origem pancreática, aumentando, assim, o requerimento nutricional do animal sob essas condições. O possível envolvimento dos inibidores no sentido de transformar maior quantidade de metionina em cistina poderia ser de grande interesse nutricional, particularmente em relação às sementes de leguminosas que já são pobres em metionina.

Quanto ao possível papel das hemaglutininas na nutrição animal e humana, o assunto é também ainda controvertido. Jaffé e Camejo (1961) demonstraram a existência de hemaglutininas tóxicas em feijões *P. vulgaris* e emitiram a hipótese de que essas proteínas agiriam ao nível da mucosa intestinal, bloqueando, inespecificamente, a assimilação normal de nutrientes.

Pusztai e Palmer (1977) demonstraram que a incorporação de uma hemaglutinina isolada de "Kidney Bean" a uma dieta com 5% de caseína afetava o valor biológico da caseína de uma maneira significativa. Por outro lado, Turner e Liener (1975) demonstraram em relação à soja exatamente o contrário, isto é, que a eliminação da hemaglutinina da soja não afetava em nada o valor biológico de suas proteínas ou que, a incorporação dessa hemaglutinina isolada em dietas contendo proteína de outra origem, não interferia no valor nutricional de tais proteínas.

No experimento realizado com a incorporação de uma hemaglutinina, isolada da fração albumina do feijão Rosinha G2 (Quadro XXXII), houve uma diminuição no valor biológico da caseína pela adição de 0,5% de hemaglutinina à dieta. Houve um decréscimo, embora não muito grande, na digestibilidade e no valor biológico aparente, bem como no ganho de peso dos animais que receberam a hemaglutinina na dieta, em relação ao controle.

As hemaglutininas, ao contrário dos inibidores de tripsina, possuem maior resistência térmica, quando o aquecimento é feito nos grãos intactos e muito menor resistência quando aquecidas em solução aquosa. De qualquer forma os grãos de leguminosas devem receber tratamento térmico adequado antes de serem ingeridos.

O feijão Rosinha G2 cru, bem como as várias frações protéicas isoladas desses grãos são de alta toxicidade para o rato (Antunes e Sgarbieri, 1979a). O efeito do tratamento térmico sobre esses grãos parece indicar que existem, nesse feijão, substâncias termolábeis que são responsáveis pela sua elevada

toxidez. Essas substâncias parecem não ser nem as hemaglutininas nem os inibidores de enzimas digestivas, uma vez que, 2 1/2 min de aquecimento dos grãos a 97°C, foram suficientes para elevar o seu valor nutritivo praticamente ao máximo, quando se detectava ainda nos extratos desses grãos apreciável atividade hemaglutinante e inibidora da tripsina. Junte-se a esse fato o de que a incorporação da hemaglutinina e dos inibidores de tripsina e de quimotripsina isolados do mesmo feijão não provocou em nenhum animal efeito tóxico pronunciado.

Ao lado dessas evidências, devemos lembrar os trabalhos publicados por Evans e col. (1974) e Evans e Bauer (1978) sugerindo a existência no feijão "Navy Bean", de substâncias termo-resistentes de baixo peso molecular e de menor toxicidade, mas, que também são responsáveis, em parte, pela inibição do crescimento e pelo baixo valor nutritivo das proteínas de feijão.

Tudo parece indicar, portanto, que a toxicidade e o baixo valor nutritivo do feijão e de suas proteínas seriam o resultado da somatória de várias substâncias tóxicas e antinutricionais, algumas delas de natureza química ainda não identificadas. A atividade e a resistência térmica desses fatores tóxicos e antinutricionais são bastante diferentes, dificultando dessa forma uma avaliação mais objetiva da natureza e da extensão das interferências individuais causadas por essas substâncias.

CONCLUSÕES

As proteínas extraídas da farinha integral do feijão Rosinha G2, em soluções salinas, apresentaram diferenças de solubilidade em função do pH, da força iônica do meio e do tratamento térmico. As duas principais frações obtidas pela extração da farinha com solução salina, seguido de diálise do extrato bruto em água destilada foram: albuminas (30%) e globulinas (70%). A separação dessas duas frações não foi completa, notando-se contaminação das albuminas com algumas "globulinas", que são parcialmente solúveis em água, em diluições elevadas.

Aquecimento dos grãos a 97°C durante 4 min reduziu de 53% a solubilidade das proteínas em água e produziu a inativação completa dos inibidores de tripsina e de quimotripsina. Ao contrário do que ocorreu no aquecimento do grão, quando as proteínas isoladas foram aquecidas em solução, ou a farinha em susensão aquosa, verificou-se uma resistência térmica muito grande dos inibidores à inativação. Concluiu-se que a inativação desses inibidores pelo aquecimento do grão se dá por algum tipo de complexação e não por desnaturação térmica. Aquecimento da fração albumina a 97°C por 15 minutos, em solução aquosa, coagulou cerca de 70% das proteínas, provocando ao mesmo tempo uma elevação da atividade específica dos inibidores.

Todas as frações protéicas, isoladas a partir do extrato bruto, continham proporções variáveis de carboidrato, forma

do dos açúcares neutros: glicose, manose, arabinose, galactose e xilose, além da glicosamina.

As proteínas solúveis em água apresentaram composição de aminoácidos mais balanceada que as insolúveis, as primeiras com teores mais elevados dos aminoácidos sulfurados e do triptofânio. Contudo, os valores de disponibilidade biológica da metionina, de digestibilidade e de valor biológico, foram bastante superiores para as proteínas da fração globulina.

O tratamento térmico, quando feito em uma suspensão ou solução aquosa, afetou a digestibilidade, *in vitro*, de maneira diferente. A porcentagem de digestibilidade aumentou significativamente para as globulinas, enquanto que a melhoria foi pequena para o isolado protéico total, para a farinha integral, para as proteínas solúveis em água e para as proteínas contidas no resíduo insolúvel. A baixa digestibilidade dessas frações foi atribuída, em parte, à não inativação dos inibidores de proteases, quando o aquecimento era feito em uma suspensão ou solução aquosa.

Aquecimento das frações albumina e globulina, tanto em pH alcalino, como em presença de agentes redutores de grupos sulfidrilos (DTT), melhorou significativamente o poder de hidrólise das enzimas digestivas (pepsina + pancreatina). Concluiu-se que tanto a presença de inibidores ativos, como a de pontes dissulfídicas nas moléculas, afetam negativamente a proteólise enzimática.

A fração protéica solúvel em água (albumina), apresen

tava atividade inibidora da tripsina e da quimotripsina bem mais elevada que a fração insolúvel.

A resistência térmica dos inibidores em soluções aquosas ou levemente ácidas foi muito grande, principalmente quando comparada com a sua fácil inativação pelo aquecimento do grão intacto.

O isolamento e a purificação dos inibidores (31 vezes em relação ao extrato bruto) permitiu a determinação de sua composição em aminoácidos, além de vários parâmetros moleculares.

Na sua composição predominaram os aminoácidos dicarboxílicos (aspártico e glutâmico) além de serina, treonina, prolina e cistina. Possuem baixos teores dos aminoácidos leucina, valina, tirosina, fenilalanina, apresentando completa ausência de triptofânio e cisteína nas moléculas. Apesar do elevado teor de 1/2 cistina (11,4%), os inibidores não continham nenhum grupo sulfidrilo livre, indicando que toda a 1/2 cistina estaria formando pontes dissulfídicas.

Os inibidores são glicoproteínas, contendo 3,75% de carboidrato total, representado por manose, xilose e glicosamina.

A preparação purificada (IG-50) apresentou duas bandas de proteína na eletroforese e na eletrofocalização com pH's isoeletrônicos 6,0 e 5,1.

Quando os componentes ativos separados na eletroforese foram isolados por eluição do gel de poliacrilamida, a atividade específica dos inibidores diminuiu drasticamente.

Os principais parâmetros moleculares dos inibidores purificados foram: peso molecular 20.000, raio molecular 20A, volume específico parcial 0,69, permitindo o cálculo de um coeficiente de difusão de $10,7 \times 10^{-7}$ e de um quociente friccional de 1,14.

O poder de inibição do IG-50 foi 3,6 vezes maior sobre a tripsina humana que sobre a tripsina bovina.

A inibição encontrada para a tripsina e para a quimotripsina bovina foi do tipo não competitivo quando a caseína foi usada como substrato. A inibição foi estequiométrica para a tripsina e não estequiométrica para a quimotripsina. A inibição da tripsina bovina, em presença do substrato sintético benzoil-DL-arginina p-nitroanilida (BAPNA), foi do tipo misto.

O valor nutricional das diversas frações protéicas do feijão Rosinha G2 foi muito baixo, principalmente em função da disponibilidade biológica da metionina. Incorporação de metionina e de cisteína às dietas, contendo a farinha integral ou várias frações protéicas como fonte de proteína, melhorou substancialmente o valor nutricional das proteínas.

A resposta à adição dos aminoácidos sulfurados foi surpreendentemente melhor para as frações protéicas isoladas que para a farinha integral, permitindo concluir sobre a existência de alguma coisa na farinha integral que inibe o crescimento do rato.

A adição dos inibidores isolados a dietas, contendo caseína como fonte protéica, não alterou os índices nutricionais.

nais da caseína e não inibiu o crescimento do rato. Por outro lado, a adição de uma hemaglutinina isolada da fração albumina, interferiu com a digestibilidade e com o valor biológico da caseína, reduzindo também o crescimento dos ratos a $2/3$ do controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERS, G.K. 1967. A new calibration procedure for gel filtration columns. J. Biol. Chem. 242:3237.
- AKESON, W.R. and M.A. STAHMANN. 1964. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. J. Nutr. 83:257.
- ALEXANDER, N.M. 1958. Spectrophotometric assay for sulfhydryl groups using N-ethylmaleimide. Anal. Biochem. 30:1292.
- ANTUNES, P.L. and V.C. SGARBIERI. 1979a. Effect of heat treatment on the toxicity and nutritive value of a dry bean (*Phaseolus vulgaris*, var. Rosinha G2) protein. J. Agric. Food Chem. (no prelo).
- ANTUNES, P.L. and V.C. SGARBIERI, 1979b. Influence of time and conditions of storage on technological and nutritional properties of a dry bean (*Phaseolus vulgaris*, L) var. Rosinha G2. J. Food Sci. 44:(6), November-December.
- ANTUNES, P.L., V.C. SGARBIERI, and R.S. GARRUTI. 1979. Nutrification of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) by methionine infusion. J. Food Sci. 44:1302.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis. Washington, D.C., 1955, 1970, 1975.
- AYKROYD, W.R. and J. DOUGHTY. 1964. Legumes in human nutrition. F.A.O. Nutritional studies n° 19, FAO, Rome, p. 138.
- BAJAJ, S. 1973. Biological value of legume proteins as influenced by genetic variation. In: Nutritional improvement of food legumes by breeding p. 223. Ed. M. Milner, Protein

Advisory Group of the United Nations System, New York.

- BALDI, G. and F. SALAMINI. 1973. Variability of essential amino acid content in seeds of 22 *Phaseolus* species. Theor. and Appl. Genetics 43:75.
- BARNES, R.H. and E. KWONG. 1965. Effect of soybean trypsin inhibitor and penicillin on cystine biosynthesis in the pancreas and its transport as exocrine protein secretion in the intestinal tract of the rat. J. Nutr. 86:245.
- BAUGH, R.J. and C.G. TROWBRIDGE. 1972. Colorimetry of some trypsin - trypsin inhibitor reactions. J. Biol. Chem. 247: 7498.
- BECKER, H.C., R.T. MILNER and R.H. NAGEL. 1940. A new method for the determination of nonprotein nitrogen in soybean meal. Cereal Chem. 17:447.
- BELITZ, H.D.; A. FUCHS; G. NITSCHKE und T. ALSULTAN. 1972. Proteinasen - Inhibitoren aus *Phaseolus vulgaris* var. nanus: Isolierung und Vergleich mit Inhibitoren anderer *Phaseolus* - Arten. Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 150:215.
- BELITZ, H.D. und FUCHS, A. 1973. Die Reactiven Zentren des Trypsin - Chymotrypsin - Inhibitors PVI₃ aus *Phaseolus vulgaris* var. nanus. Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 152:129.
- BIRK, Y. 1968. Chemistry and nutritional significance of proteinase inhibitors from plant sources. Ann. N.Y. Acad. Sci. 146:388.
- BIRK, Y.; A. GERTLER and S. KHALEF. 1967. Further evidence for a dual, independent, activity against trypsin and α -chymotrypsin of inhibitor AA from soybeans. Biochim. Biophys.

Acta 147:402.

BLACKBURN, S. 1968. Amino acid determination. Methods and techniques. p. 23, Marcel Dekker, Inc.; New York.

BOHLOOL, B.B. and E.L. SCHMIDT. 1974. Lectins: A possible basis for specificity in the *Rhizobium* - legume root nodule symbiosis. Science 185:269.

BOONVISUT, S. and J.R. WHITAKER. 1976. Effect of heat, amylase and sulfide bond cleavage on the *in vitro* digestibility of soybean proteins. J. Agric. Food Chem. 24:1130.

BORCHERS, R.; C.W. ACKERSON and R.M. SANDSTEDT. 1947. Trypsin inhibitor III. Determination and heat destruction of the trypsin inhibitor of soybeans. Arch. Biochem. 12:367.

BOWMAN, D.E. 1948. Further differentiation of bean trypsin inhibiting factors. Arch. Biochem. 16:109.

BRESSANI, R.; M. FLORES and L.G. ELIAS. 1973. Acceptability and value of food legumes in the human diet. In: Potentials of field beans and other food legumes in Latin America p. 17, Cali, Colombia, February 26- March 1 (Symposium).

BROTH, A.N.; D.J. ROBBINS; W.E. REBELIN and F. DE EDS. 1960. Effect of raw soybean meal and amino acids on pancreatic hypertrophy in rats. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 104:681.

CARROLL, R.W.; G.W. HENSLEY; C.L. SITTLER; E.L. WILCOX and W.R. GRAHAM Jr. 1953. Absorption of nitrogen and amino acids from soybean meal as affected by heat treatment or supplementation with Aureomycin and methionine. Arch. Biochem. Biophys. 45:260.

- COLE, R.D. 1967. Sulfitolysis. *Methods Enzymol.* 11:197.
- CONSTANTINIDES, S.M.; V.C. SGARBIERI and M.A.M. GALEAZZI. 1979. Experimentos em Bioquímica e em Nutrição (Manual de laboratório em preparação).
- DAVIS, B.J. 1964. Disk eletrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121:404.
- DESIKACHAR, H.S.R. and S.S. DE. 1947. Role of inhibitors in soybean. *Science* 106:421.
- DICKSON, M.H. and L.R. HACKLER. 1973. Protein quantity and quality in high-yielding beans. In: Nutritional improvement of food legume by breeding p. 185. Ed. M. Milner, Protein Advisory Group of the United Nations System, New York.
- DUBOIS, M.; K.A. GILLES; J.K. HAMILTON; P.A. REBERS and F. SMITH. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350.
- EVANS, A.M. 1973. Genetic improvement of *Phaseolus vulgaris*. In: Nutritional improvement of food legumes by breeding, p. 107. Ed. M. Milner, Protein Advisory Group of the United Nations System, New York.
- EVANS, R.J. and S.L. BANDEMER. 1967. Nutritive value of legume seed proteins. *J. Agric. Food. Chem.* 15:439.
- EVANS, R.J. and D.H. BAUER. 1978. Studies of the poor utilization by the rat of methionine and cystine in heated dry bean seed (*Phaseolus vulgaris*). *J. Agric. Food Chem.* 26:779.
- EVANS, R.J.; D.H. BAUER; K.A. SISAK and P.A. RYAN. 1974. The availability for the rat of methionine and cystine contained

- in dry bean seed (*Phaseolus vulgaris*). J. Agric. Food Chem. 22:130.
- F.A.O./W.H.O. 1973. Report of the Joint F.A.O./W.H.O - Ad Hoc Expert Committee. World Health Organization, Geneva. Technical Report Series N° 522, p. 53.
- FEENEY, R.E.; G.E. MEANS and J.C. BIGLER. 1969. Inhibition of human trypsin, plasmin and thrombin by naturally occurring inhibitors of proteolytic enzymes. J. Biol. Chem. 244:1957.
- FIGARELLA, C.; G.A. NEGRI; and O. GUY. 1975. The human trypsinogens. Inhibition spectra of the two human trypsins derived from their purified zymogens. Europ. J. Biochem. 53:457.
- FRAENKEL-CONRAT, H.; R.S. BEAN and H. LINEWEAVER. 1949. Essential groups for the interaction of ovomucoid (egg white trypsin inhibitor) and trypsin, and for tryptic activity. J. Biol. Chem. 177:385.
- FRAENKEL-CONRAT, H.; R.C. BEAN; E.D. DUCAY and H.S. OLCOTT. 1952. Isolation and characterization of a trypsin inhibitor from Lima Beans. Arch. Biochem. Biophys. 37:393.
- FRATTALI, V. and R.F. STEINER. 1969. Interaction of trypsin and chymotrypsin with a soybean proteinase inhibitor. Biochem. Biophys. Res. Comm. 34:480.
- GREEN, N.M. 1953. Competition among trypsin inhibitors. J. Biol. Chem. 205:535.
- GREEN, G.M. and R.L. LYMAN. 1972. Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion as a mechanism for a trypsin-induced hipersecretion in rats. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 140:291.

- GREEN, G.M.; B.A. OLDS; G. MATHEUS and R.L. LYMAN. 1973. Protein as a regulator of pancreatic enzyme secretion in the rat. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 142:1162.
- GREEN, N.M. and E. WORK. 1953. Pancreatic trypsin inhibitor. 2- Reaction with trypsin. Biochem. J. 54:347.
- HACKLER, L.R. and M.H. DICKSON. 1972. A comparison of amino acid and nitrogen content of pods and seeds of beans (*Phaseolus vulgaris*, L). Search 3: n° 5, N.Y.S. Agric. Exptl. Sta; Geneva, New York.
- HIRS, C.H.W. 1967. Performic acid oxidation. Methods Enzymol. 11:197.
- HONAVAR, P.M.; C. SHIH and I.E. LIENER. 1962. Inhibition of growth of rats by purified hemagglutinin fractions isolated from *Phaseolus vulgaris*. J. Nutr. 77:109.
- ISHINO, K. and M. L. ORTEGA D. 1975. Fractionation and characterization of major reserve proteins from seeds of *Phaseolus vulgaris*. J. Agric. Food Chem. 23:529.
- JAFFÉ, W.G. 1962. Fucosa, xilosa y galactosa identificados en una glicoproteína obtenida de Caraotas negras (*Phaseolus vulgaris*). Acta Cient. Venez. 13:100.
- JAFFÉ, W.G. 1950a. El valor biológico comparativo de algunas leguminosas de importância en la alimentacion venezolana. Arch. Venez. Nutr. 1:107.
- JAFFÉ, W.G. 1950b. Protein digestibility and trypsin inhibitor activity of legume seeds. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 75: 219.

- JAFFÉ, W.G. 1973. Factors affecting the nutritional value of beans. In: Nutritional improvement of food legumes by breeding. p. 43. Ed. M. Milner, Protein Advisory Group of the United Nations System, New York.
- JAFFÉ, W.G. and O. BRÜCHER. 1972. Toxicidad y especificidad de diferentes fitohemagglutininas de frijoles (*Phaseolus vulgaris*). Arch. Latinoam. Nutr. 22:267.
- JAFFÉ, W.G. and O. BRÜCHER. 1974. El contenido de nitrógeno total y aminoácidos azufrados en diferentes líneas de frijoles (*Phaseolus vulgaris*). Arch. Latinoam. Nutr. 24:107.
- JAFFÉ, W.G.; O. BRÜCHER and A. PELOZZO. 1972. Detection of four types of specific phytohemagglutinins in different lines of beans (*Phaseolus vulgaris*). Z. Immun. Forsch. 142:439.
- JAFFÉ, W.G. and G. CAMEJO. 1961. La acción de una proteína tóxica aislada de caraotas negras (*Phaseolus vulgaris*) sobre la absorción intestinal en ratas. Acta Cient. Venez. 12:59.
- JAFFÉ, W.G. and K. HANNIG. 1965. Fractionation of proteins from Kidney Beans (*Phaseolus vulgaris*). Arch. Biochem. Biophys. 109:80.
- JAFFÉ, W.G.; A. LEVY and D.I. GONZÁLEZ. 1974. Isolation and partial characterization of bean phytohemagglutinins. Phytochemistry 13:2685.
- JAFFÉ, W.G. and G.L. VEGA LETTE. 1968. Heat-labile growth inhibiting factors in beans. J. Nutr. 94:203.
- JAMALIAN, J. and P.L. PELLET. 1968. Nutritional value of Middle Eastern foodstuffs. Amino acid composition. J. Sci. Food Agric. 19:378.

- JAYNE-WILLIAMS, D.J. 1973. The influence of dietary jack bean (*Canavalia ensiformis*) and of Concanavalin A on the growth of conventional and gnotobiotic Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Nature New Biol.* 243:150.
- JAYNE-WILLIAMS, D.J. and C.D. BURGUESS. 1974. Further observations on the toxicity of Navy Beans (*Phaseolus vulgaris*) for Japanese quail (*Coturnix japonica*). *J. Appl. Bacteriol.* 37: 149.
- JOHNSON, V.A.; J.W. SCHMIDT and P.J. MATTERN. 1968. Cereal breeding for better protein impact. *Econ. Bot.* 22:16.
- JONES, G.; S. MOORE and W.H. STEIN. 1963. Properties of chromatographically purified trypsin inhibitors from lima beans. *Biochemistry* 2:66.
- JUNQUEIRA, R.G. 1979. Purificação e propriedades de hemaglutininas de uma variedade brasileira de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L). Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
- KAKADE, M.L.; R.L. ARNOLD; I.E. LIENER and P.E. WAIBEL. 1969. Unavailability of cystine from trypsin inhibitor as a factor contributing to the poor nutritive value of navy beans. *J. Nutr.* 99:34.
- KAKADE, M.L. and R.J. EVANS. 1965. Nutritive value of navy beans (*Phaseolus vulgaris*). *Brit. J. Nutr.* 19:269.
- KAKADE, M.L. and R.J. EVANS. 1965. Growth inhibition of rats fed navy bean fractions. *J. Agric. Food Chem.* 13:450.
- KAKADE, M.L.; N. SIMONS and I.E. LIENER. 1969. An evaluation of natural vs synthetic substrates for measuring the antitryptic

- activity of soybean samples. Cereal Chem. 46: 518.
- KAKADE, M.L.; J.E. SMITH and R. BORCHERS. 1968. Effect of a navy bean fraction on protein synthesis in rats. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 128:811.
- KAKADE, M.L.; D.H. SWENSON and I.E. LIENER. 1970. Note on the determination of chymotrypsin and chymotrypsin inhibitor activity using casein. Anal. Biochem. 33:255.
- KASSELL, B. 1970. Inhibitors of proteolytic enzymes of natural occurrence. In: Methods Enzymol., p. 839. Eds. Sidney P. Colowick and Nathan O. Kaplan, vol. XIX.
- KELLY, J.F. 1971. Genetic variation in the methionine levels of mature seeds of common bean (*Phaseolus vulgaris*, L). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 96:561.
- KELLY, J.F. 1973. Increasing protein quantity and quality. In: Nutritional improvement of food legumes by breeding; p. 179. Ed. M. Milner, Protein Advisory Group of the United Nations System, New York.
- KONIJN, A.M.; K. GUGGENHEIM and Y. BIRK. 1969. Amylase synthesis in pancreas of rats fed soybean flour. J. Nutr. 97:265.
- KREBS, K.G.; D. HEUSSER and H. WIMMER. 1969. Spray reagents. In: Thin layer chromatography, 2nd ed. p. 857. Ed. E. Stahl, Springer-Verlag, New York.
- KUNITZ, M. 1945. Crystallization of a trypsin inhibitor from soybeans. Science 101:668.
- KUNITZ, M. 1946. Crystalline soybean trypsin inhibitor. I. Method of isolation. J. Gen. Physiol. 29:149.

- KUNITZ, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. J. Gen. Physiol. 30:291.
- KWONG, E, and R.H. BARNES. 1963. Effect of soybean trypsin inhibitor on methionine and cystine utilization. J. Nutr, 84:392.
- LALIJI, O.I.; M.H. DICKSON; L.V. GROWDER and J.B. BOURKE. 1972. Inheritance of crude protein percentage and its correlation with seed yield in beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). Crop. Sci. 12:168.
- LANTZ, E.M.; H.W. GOUGH and A.M. CAMPBELL. 1958. Effect of variety, location and years on the protein and amino acid contents of dry beans. J. Agric. Food Chem. 6:58.
- LASKOWSKI, M. and M. LASKOWSKI, Jr. 1954. Naturally occurring trypsin inhibitors. Advan. Protein Chem. 9:203.
- LIENER, I.E. 1951. The intraperitoneal toxicity of concentrates of the soybean trypsin inhibitor. J. Biol. Chem. 193:183.
- LIENER, I.E. 1962. Toxic factors in edible legumes and their elimination. Amer. J. Clin. Nutr. 11:281.
- LIENER, I.E. 1973. Antitryptic and other antinutritional factors in legumes. In: Nutritional Improvement of food legumes by breeding, p. 239. Ed. M. Milner, Protein Advisory Group of the United Nations System, New York.
- LIENER, I.E. 1976. Legume toxins in relation to protein digestibility - A review. J. Food Sci. 41:1076.
- LIENER, I.E. 1979. Significance for humans of biologically active factors in soybeans and other food legumes. Proc. world Conference on Vegetable Food Proteins. J. Amer. Oil. Chem.

Soc. 56:99.

LIENER, I.E.; H.J. DEUEL Jr. and H.L. FEVOLD. 1949. The effect of supplemental methionine on the nutritive value of diets containing concentrates of the soybean trypsin inhibitor. J. Nutr. 39:325.

LIENER, I.E. and M.L. KAKADE. 1969. Protease inhibitors. In: Toxic Constituents of Plant Foodstuffs, p. 7, Ed. I.E. Liener. Academic Press, New York.

LINDEMANN, W.C.; E.L. SCHMIDT and G.E. HAM. 1974. Evidence for double infection with soybean nodules. Soil Sci. 118:274.

LINEWEAVER, H. and D. BURK. 1934. The determination of enzyme dissociation Constants. J. Amer. Chem. Soc. 56:658.

LUNDER, T.L. 1973. An improved method for the colorimetric determination of methionine in acid hydrolysates of biological products. Ind. Aliment. 12:94.

LYMAN, R.L. and S. LEPKOVSKY. 1957. The effect of raw soybean meal and trypsin inhibitor diets on pancreatic enzyme secretion in the rat. J. Nutr. 62:269.

LYMAN, R.L.; S.S. WILCOX and E.R. MONSEN. 1962. Pancreatic enzyme secretion produced in the rat by trypsin inhibitors. J. Physiol. 202:1077.

LYMAN, R.L.; B.A. OLDS and G.M. GREEN. 1974. Chymotrypsinogen in the intestine of rats fed soybean trypsin inhibitor and its inability to suppress pancreatic enzyme secretion. J. Nutr. 104:105.

MARTIN, R.G. and B.N. AMES. 1961. A method for determining the

- sedimentation behavior of enzymes: application to protein mixtures. J. Biol. Chem. 236:1372.
- MEANS, G.E., D.S. RYAN and R.E. FEENEY. 1974. Protein inhibitors of proteolytic enzymes. Accounts Chem. Res. 7:315.
- MILLER, D.S. and A.E. BENDER. 1955. The determination of the net utilization of proteins by a shortened method. Brit. J. Nutr. 9:382.
- MITCHELL, H.H. 1923. A method of determining the biological value of protein. J. Biol. Chem. 58:873.
- MOORE, W.J. 1964. Physical Chemistry, p. 757. Prentice - Hall, Inc; Englewood Cliffs, London.
- MORAES, R.M. and E. ANGELUCCI. 1971. Chemical composition and amino acid contents of Brazilian beans (*Phaseolus vulgaris*). J. Food Sci. 36:493.
- NEILANDS, J.B. 1952. Studies on lactic dehydrogenase of heart. I. Purity kinetics and equilibria. J. Biol. Chem. 199:373.
- NESHEIM, M.; J.D. GARLICH and D.T. HOPKINS. 1960. Studies on the effect of raw soybean meal on fat absorption in young chicks. J. Nutr. 78:89.
- NISS, E.; C.A. IVY and M. NESHEIM. 1972. Stimulation of Gall bladder emptying and pancreatic secretion in chicks by soybean whey protein. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 140:291.
- NITSAN, Z. and E. ALUMOT. 1964. Overcoming the inhibition of intestinal proteolytic activity caused by raw soybean in chicks of different ages. J. Nutr. 84:179.

- NOWAKOVÁ, N. and J. KOCOUREK. 1974. Studies on phytohemagglutinins. XX. Isolation and characterization of hemagglutinins from scarlet runner seeds (*Phaseolus coccineus*, L). Biochem. Biophys. Acta 359:320.
- NUTRITIONAL BIOCHEMICALS CORPORATION. 1977/78. Vitamin diet for tification mixture. Diet catalog ICN, p. 24, Cleveland, Ohio.
- OSBORNE, T.B. 1894. The proteids of the Kidney bean. J. Amer. Chem. Soc. 16:633, 703, 757.
- OSBORNE, T.B. and L. B. MENDEL. 1917. The use of soybean as food. J. Biol. Chem. 32:369.
- PANT, R. and D.R. P. TULSIANI. 1969. Solubility, amino acid composition, and biological evaluation of proteins isolated from leguminous seeds. J. Agric. Food Chem. 17:361.
- PORATH, J. and P. FLODIN. 1959. Gel filtration: A method for desalting and group separation. Nature 183:1657.
- PUSZTAI, A. 1966. The isolation of two proteins, glycoprotein I and trypsin inhibitor, from the seeds of Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). Biochem. J. 101:379.
- PUSZTAI, A. 1967. Trypsin inhibitors of plant origin, their chemistry and potential role in animal nutrition. Nutr. Abstr. Review. 37:1.
- PUSZTAI, A. 1968. General properties of a protease inhibitor from the seeds of Kidney bean. Europ. J. Biochem. 5:252.
- PUSZTAI, A. and R. PALMER. 1977. Nutritional evaluation of Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*): the toxic principle. J. Sci. Fd. Agric. 28:620.

- PUSZTAI, A. and W.B. WATT. 1970. Glycoprotein II. The isolation and characterization of a major antigenic and non-hemagglutinating glycoprotein from *Phaseolus vulgaris*. Biochem. Biophys. Acta. 207:413.
- RACKIS, J.J. 1965. Physiological properties of soybean trypsin inhibitors and their relationship to pancreatic hipertrophy and growth inhibition of rats. Fed. Proc. 24:1488.
- RACKIS, J.J.; J.E. Mc GHEE and A.N. BROTH. 1975. Biological threshold levels of soybeans trypsin inhibitors by rat bioassay. Cereal Chem. 52:85.
- RACKIS, J.J., H.A. SASAME; R.K. MANN; R.L. ANDERSON and A.K. SMITH. 1962. Soybean trypsin inhibitors: isolation, purification and physical properties. Arch. Biochem. Biophys. 98:471.
- ROBINSON, L.A.; W.J. KIM; T.T. WHITE and B.H. HADORN. 1972. Trypsins in human pancreatic juice - Their distribution as found in 34 specimens. Two human pancreatic trypsinogens. Scand. J. Gastroenterol. 7:43.
- ROGERS, Q.R. and A.E. HARPER. 1965. Amino acid diets and maximal growth in the rat. J. Nutr. 87:267.
- ROMERO, J. and D.S. RYAN. 1978. Susceptibility of the major storage protein of the bean, *Phaseolus vulgaris*, L, to *in vitro* enzymatic hydrolysis. J. Agric. Food Chem. 26:784.
- ROTHMAN, S.S. and H. WELLS. 1969. Selective effects of dietary eggwhite trypsin inhibitor on pancreatic enzyme secretion. Amer. J. Physiol. 216:504.
- RUTGER, J.N. 1970. Variation in protein content and its relation

to other characters in beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) Rept.
Tenth Dry Bean Research Conference, Davis, Calif. 10:59.

SATTERLEE, L.D.; M. BEMBERS and J. G. KENDRICK. 1975. Functional properties of the great northern bean (*Phaseolus vulgaris*) protein isolate. J. Food Sci. 40:81.

SCHACHMAN, H.K. 1957. Ultracentrifugation, diffusion, and viscometry. In: Methods Enzymol. 4:32.

SCHNEEMAN, B.O. and R.L. LYMAN. 1975. Factors involved in the intestinal feedback regulation of pancreatic enzyme secretion in the rat. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 142:162.

SEIDL, D.; M. JAFFÉ and W.G. JAFFÉ. 1969. Digestibility and protease inhibitory action of a Kidney bean globulin. J. Agric. Food Chem. 17:1318.

SGARBIERI, V.C. 1979. Estudo do conteúdo e de algumas características das proteínas de sementes de plantas leguminosas. Ciência e cultura (no prelo).

SGARBIERI, V.C.; P.L. ANTUNES e M.A.M. GALEAZZI. 1978. Estudo da fração nitrogenada em 60 cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*). Ainda não publicado.

SGARBIERI, V.C.; P.L. ANTUNES and L.D. ALMEIDA. 1979. Nutritional evaluation of four varieties of dry bean (*Phaseolus vulgaris*, L). J. Food Sci. 44:1306.

SHARON, N. and H. LIS. 1972. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. Science 177:949.

SILVA, V.R. and A. IACHAN. 1975. Proteins from varieties of Brazilian beans (*Phaseolus vulgaris*). I. Quantification and

- fractionation of proteins. Rev. Brasil. Tecnol. 6:133.
- SMITH, C.R. Jr; F.R. EARLE; I.A. WOLFF and Q. JONES. 1959. Com
parison of solubility characteristics of selected seed pro
teins. J. Agric. Food Chem. 7:133.
- SPACKMAN, D.H.; W.H. STEIN and S. MOORE. 1958. Automatic re-
cording apparatus for use in the chromatography of amino
acids. Anal. Chem. 30:1190.
- SPIES, J.R. 1967. Determination of tryptofhan in proteins. Anal.
Chem. 39:1412.
- SPRINGALL, H.D. 1954. The structural Chemistry of proteins, p.
135. Butterworths Scientific Publication.
- SUN, S.M. and T.C. HALL. 1975. Solubility characteristics of
globulins from *Phaseolus* seeds in regard to their isolation
and characterization. J. Agric. Food Chem. 23:184.
- SWEELEY, C.C.; R. BENTLEY; M. MAKITA and W.W. WELLS. 1963. Gas-
liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of
sugars and related substances. J. Amer. Chem. Soc. 85:2497.
- TANDON, O.B.; R. BRESSANI; N.S. SCHRIMSHAW and F. LE BEAN. 1957.
Nutritive value of beans. Nutrients in Central American beans.
J. Agric. Food Chem. 5:137.
- TRAVIS, J. and ROBERTS, R.C. 1969. Human trypsin. Isolation and
physical-chemical characterization. Biochemistry 8:2884.
- TURNER, R.H. and I.E. LIENER. 1975. The effect of the selective
removal of hemagglutinins on the nutritive value of soybeans.
J. Agric. Food Chem. 23:484.

- YAMAMOTO, M. and T. IKENAKA. 1967. Studies on soybean trypsin inhibitors. I. Purification and characterization of two soybean trypsin inhibitors. J. Biochem. 62:141.
- WAGNER, L.P. and J.P. RIEHM. 1967. Purification and partial characterization of a trypsin inhibitor isolated from the navy bean. Arch. Biochem. Biophys. 121:672.
- WEAST, R.C. and S.M. SELBY (EDS). 1966/67. Handbook of chemistry and physics, Normal curve of error p. A - 153. The Chemical Rubber Company.
- WEBB, J.L. 1963. Enzyme and metabolic inhibitors, vol.1, p. 157. Academic Press, New York.
- WEBER, K. and M. OSBORN. 1969. The reliability of molecular weight determination by sodium dodecil sulfate poliacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244:4406.
- WEBER, J.K.P. 1973. Cleavage of a trypsin. Chymotrypsin inhibitor from *Phaseolus vulgaris* in active fragments. 2. Lebensm. Unters.-Forsch. 153:83.
- WEICHSELBAUM, T.E. 1946. An accurate and rapid method for the determination of protein in small amount of blood serum and plasma. Amer. J. Clin. Pathol. Tech. Suppl. 10:40.
- WESTFALL, R.J; D.K. BOSSHARDT and B.H. BARNES. 1948. Influence of crude trypsin inhibitor on utilization of hydrolyzed protein. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 68:498.
- WRIGLEY, C.W. 1968. Analytical fractionation of plant and animal proteins by gel electrofocusing. J. Chromat. 36:362.
- WU, Y.V. and H.A. SCHERAGA. 1962. Studies of soybean trypsin inhibitor. I. Physicochemical properties. Biochemistry 1:698.