

Todavia, apesar das reduções de direitos nominais resultantes dos acordos celebrados, verificou-se entre 1964 e 1970 algum acréscimo de protecção efectiva, de uma média de 48,8% para 50,7% como consequência de diminuições na tributação de determinados bens intermediários, correspondendo assim ao interesse dos sectores produtivos em que eram utilizados.

No início dos anos 70 houve já claramente um avanço livre-cambista, para o qual contribuiu a celebração e, em 1972, de um acordo comercial com a CEE e a diminuição de relevo de uma pauta fundamentalmente específica, quando começaram a aumentar sensivelmente os preços dos bens importados (mas mesmo então foi menor a diminuição da protecção efectiva).

Os anos de 1975-1976 foram, na sequência da primeira crise do petróleo e mais directamente da situação política do país, marcados por um drástico incremento da intervenção no comércio internacional. Tratou-se de intervenção determinada por objectivos fundamentalmente conjunturais, de redução do défice da balança dos pagamentos e de manutenção da produção e do emprego, mas que, de qualquer modo, constituíram um retrocesso na caminhada livre-cambista. Para o efeito utilizaram-se simultaneamente ou sucessivamente vários meios, como foram os casos das sobretaxas sobre as importações desde 1975 (elevadas em 1976, ano em que, com um propósito de salvaguarda de receitas, foram ainda aumentados para o dobro os valores dos arts. de 26 caps. da pauta), de depósitos prévios em relação às importações entre 1975 e 1976, da exigência com intuítos restricionistas (e não apenas estatísticos) de boletins de registo de importação (BRI), de restrições cambiais e de desvalorizações do escudo a partir de 1977. Nesse ano deu-se o arranque para uma nova caminhada livre-cambista, simbolizada pelo pedido de adesão à CEE, depois de em 1976 ter havido uma renegociação do acordo comercial anterior e de ter sido abolido o regime de depósitos prévios. Progressivamente foi-se reduzindo também o valor das sobretaxas e foram-se verificando reduções resultantes dos compromissos assumidos não só em relação à Comunidade como ainda em relação à EFTA e ao GATT.

Alguns acréscimos de intervenção mais recentes, verificados principalmente no início das décadas de 80 e 90, foram determinados de novo por razões conjunturais, intervenção pautal que em muitos casos foi determinada mais por uma preocupação reditícia, em pouco restringindo o volume das importações (pauta).

Com a entrada na CEE, em 1.1.1986, ficou afastada a possibilidade de Portugal ter uma política proteccionista própria, devendo agora procurar que a política comunitária corresponda aos seus interesses (p. ex., aos interessados de sectores de reestruturação), sendo, todavia, em geral, do nosso interesse que a União Europeia seja um espaço de abertura em relação a terceiros, com apoios estruturais (directos) à preparação da economia portuguesa para a concorrência do comércio internacional.

M. C. LOPES PORTO

BIBL.: G. Haberler, *The Theory of International Trade — With its Applications to Commercial Policy* (trad.), Londres, 1936; id., «Some problems in the Pure Theory

of International Trade», in *Economic Journal*, 60 (1950); H. Johnson, «Optimal Trade Intervention in the Presence of Domestic Distortions», in R. Baldwin et al. (eds.), *Trade, Growth and the Balance of Payments*, Chicago, 1965; R. Baldwin, «The Case Against Infant-Industry Tariff Protection», in *Journal of Political Economy*, 77 (1969); J. Bhagwati, «The generalized Theory of Distortions and Welfare», in J. Bhagwati, R. Jones, R. Mundell e J. Vanek (eds.), *Trade, Balance of Payments and Growth*, Amsterdão/Londres, 1971; M. Corden, *The Theory of Protection*, Oxford, 1971; id., *Trade Policy and Economic Welfare*, Oxford, 1997; M. Ribeiro, *Conflitos Ideológicos do século XIX — O Problema Pautal*, Coimbra, 1976; R. Amacher, G. Haberler e T. Willet (eds.), *Challenges to a Liberal International Economic Order*, Washington, 1979; D. Greenaway e C. Milner, *Protection Again...? Causes and Consequences of a Retreat from freer Trade to economic Nationalism*, Londres, 1979; M. Porto, *O argumento das Indústrias Nascentes*, Coimbra, 1979; id., *Estrutura e Política Alfandegários — O Caso Português*, Coimbra, 1982; id., *Teoria da Integração e Políticas Comunitárias*, Coimbra, 2001; K. Anderson e R. Baldwin, *The Political Market for Protection in Industrial Countries: Empirical Evidence*, Washington, 1981; B. Frey, *International Economy*, Oxford, 1984; P. Krugam, «Is Free Trade Passe?», in *Journal of Economic Perspectives*, 1987; D. Salvatore, *The New Protectionist Threat to World Welfare*, Nova Iorque, 1987; J. Macedo, C. Corado e M. Porto, *The Timing and Sequencing of Trade Liberalization Policies: Portugal 1948-1986*, Lx., 1988; N. Voudsen, *The Economics of Trade Protection*, Cambridge, 1990; P. Fontoura, «A Economia Política do Protecçãoismo» e «Medição do Grau de Protecção», em A. Castro (ed.), *Política Comercial*, Lx., 1992; R. Batra, *The Myth of Free Trade. A Plan for America's Economic Revival*, Nova Iorque, 1993; T. Lang e C. Hines, *The New Protectionism. Protecting the Future Against Free Trade*, Londres, 1994; S. Magee, «The Political Economy of Trade Policy», em D. Greenaway e L. Winters (ed.), *Surveys in International Trade*, 1994; P. Lindert e T. Pugel, *International Economics*, Chicago, 1996; J. Melo e J. Grether, *Commerce International. Théories et Applications*, Paris/Bruxelas, 1997.

proteína-dissulfeto isomerase — BIOQ.

EC 5.3.4.1. Também denominada dissulfeto rearranjase ou S-S rearranjase.

Catalisa o rearranjo das ligações de persulfureto presentes nas proteínas. Aumenta, por isso, a taxa a que decorre a troca dos grupos ligados a duas ou mais ligações de persulfureto numa proteína, quer sejam inter- quer intracadeia polipeptídica. A enzima catalisa aleatoriamente a quebra e a reformação das ligações de persulfureto da proteína-substrato, alterando-as sucessivamente à medida que a proteína vai assumindo, progressivamente, conformações mais favoráveis do ponto de vista termodinâmico, no seu caminho para adquirir a estrutura de nível terciário correspondente à forma nativa (↗Proteínas). Requer a presença de agentes redutores ou da enzima na forma parcialmente reduzida. A enzima contém três resíduos de cisteína, um dos quais tem de ocorrer na forma -SH para a actividade enzimática. Foi primeiramente descrita e denominada rearranjase, em 1966, por Anfinsen, a propósito da experiência clássica de desnaturação e subsequente renaturação *in vitro* da enzima ribonuclease.

A P.-D. I. está presente no lúmen do retículo endoplasmático. É um homodímero, com dois dos seus domínios de estrutura homólogos à tiorredoxina de *Escherichia coli*. É também a proteína de transferência de triacilgliceróis (MTP) que participa, no retículo endoplasmático, na

incorporação de lípidos em lipoproteínas. Funciona como a subunidade β da procolagênio-prolina dioxigenase.

R. BOAVIDA FERREIRA

proteínas — BIOQ. I PROTEÍNAS: 1. Generalidades. 2. Classificação: A) *Albuminas*; B) *Globulinas*; C) *Prolaminas*; D) *Glutelinas*; E) *Escleroproteínas (albuminóides)*; F) *Histonas*; G) *Prolaminas*. 3. Estrutura: A) *Hierarquias na estrutura das proteínas*; B) *Estrutura de nível primário*; C) *Estrutura de nível secundário*; D) *Estrutura supersecundária*; E) *Estrutura de nível terciário*; F) *Domínios de estrutura*; G) *Estrutura de nível quaternário*; H) *Desnaturação das proteínas*; I) *Envolvimento espontâneo das proteínas*. 4. «Turnover» de proteínas. 5. Síntese de proteínas. 6. Degradação de proteínas; II Proteína A; III Proteínas AGP; IV Proteína B; V Proteína C; VI Proteínas da carne; VII Proteínas dos cereais; VIII Proteínas de choque térmico; IX Proteína cinase; X Proteína fosfatase; XI Proteína G; XII Proteínas das leguminosas; XIII Proteínas do leite; XIV Proteínas do músculo; XV Proteínas do ovo; XVI Proteínas do pão; XVII Proteínas de patogênese; XVIII Proteínas PR; XIX Proteínas do queijo; XX Proteína S; XXI Proteínas tóxicas; XXII Proteínas do vinho; XXIII Proteínas Z.

I PROTEÍNAS

1. Generalidades — As P. são polímeros lineares de \mathcal{N} aminoácidos, numa dada sequência, ligados uns aos outros por \mathcal{N} ligações peptídicas, podendo atingir massas moleculares superiores a 2 MDa. Formam um grande grupo de compostos orgânicos que são constituintes macromoleculares de todas as células vivas. Constituem mais de 50% dos componentes orgânicos do protoplasma. Em termos de massa, formam o principal componente da matéria seca dos organismos vivos, sendo dos principais componentes funcionais das células vivas.

Tem sido sugerido que o termo «proteínas» deve ser apenas usado para incluir todos os polipéptidos e péptidos de menor massa molecular sintetizados nos complexos mRNA-ribossoma (polissomas). Polipéptidos e outras associações de aminoácidos, quer naturais quer artificiais, que são sintetizados na ausência de ribossomas e sem o envolvimento directo de informação genética não são incluídos. A palavra «proteínas» tem a sua origem na palavra grega *protos*, que significa «primeiro», realçando o papel que desempenham em todas as células vivas. Sendo polímeros de aminoácidos, são constituídas por carbono, hidrogénio, oxigénio e azoto, podendo ou não conter quantidades variáveis de enxofre, fósforo e metais (p. ex.: Zn, Cu, Fe, Mn, etc. — \mathcal{N} Símbolo). O enxofre ocorre nas P. na composição dos aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina), ao passo que o fósforo não entra na constituição de nenhum dos aminoácidos que formam as P., mas sim na forma de ácido fosfórico, esterificado ao grupo oxidrilo de um resíduo de serina ou ao grupo NH do anel heterocíclico de um resíduo de histidina.

As P. são constituídas por uma ou mais cadeias polipeptídicas. O tamanho de cada cadeia polipeptídica é muito variável. A apolipoproteína B, uma P. que transporta colesterol, representa provavelmente o limite superior, com uma só cadeia

polipeptídica composta por 4636 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular de 513 kDa. É espantoso que uma só classe de moléculas biológicas — as P., basicamente constituídas a partir de um conjunto de 20 aminoácidos proteicos — possam desempenhar tantas e tão diversas funções, desde biocatálise (conhecem-se mais de 3000 enzimas diferentes), transporte (p. ex.: hemoglobina do sangue), reserva (p. ex.: P. de reserva das sementes), movimento (p. ex.: miosina do músculo), estrutura (p. ex.: colagénio dos tendões), defesa (p. ex.: imunoglobulinas ou anticorpos), regulatórias (p. ex.: insulina), etc. Fundamentalmente, as P. diferem umas das outras por apresentarem diferentes sequências dos 20 aminoácidos proteicos, ou melhor, diferentes sequências das 20 cadeias laterais R. Tal resulta num número infinito de P. que se podem formar a partir dos 20 aminoácidos primários. Sendo r o grau de polimerização, o número de péptidos e P. diferentes que se podem formar com base nos 20 aminoácidos proteicos (trata-se de arranjos com repetição) é dado por:

para $r = 1$, monopéptidos, $20^1 = 20$;

para $r = 2$, dipéptidos, $20^2 = 400$;

para $r = 3$, tripéptidos, $20^3 = 8000$.

para $r 20^r \approx 10^{1,30r}$

Considerando então uma pequena P. com $r = 100$ (muitas P. são formadas por muitas centenas ou milhares de resíduos de aminoácidos), o número de sequências possíveis diferentes será de $20^{100} \approx 10^{150}$. A magnitude deste número astronómico pode ser apreciada se considerarmos que ele é 10^{51} vezes maior que a estimativa do número total de átomos do nosso Universo (10^{79}), composto por milhares de milhões de galáxias — só a nossa com c. 200 000 000 000 de estrelas. Estima-se que existam c. 100 000 P. diferentes no corpo humano. Uma célula de *Escherichia coli* terá c. 5000. Alguns dos aminoácidos proteicos podem ser covalentemente modificados nas P., num mecanismo de pós-tradução, levando à síntese dos chamados aminoácidos raros das P., o que aumenta para c. 200 os resíduos diferentes de aminoácidos que podem ocorrer naturalmente nas P. Muitos outros tipos de moléculas podem ser ligados às P.

2. Classificação — Uma classificação lógica e sistemática de centenas de milhar ou mais de P. que ocorrem na natureza, com base nas suas estruturas de nível primário e terciário, é uma tarefa impossível de realizar. Há, no entanto, alguns critérios simples de classificar as P. que têm sentido prático. Assim, p. ex., estes polímeros podem ser subdivididos em P. com e sem função enzimática, ou, de acordo com a sua origem, em virais, bacterianas, vegetais e animais. As diferentes P., dentro do organismo de um animal superior, podem depois subdividir-se em P. do sangue, leite, músculo, estruturais, etc. A localização subcelular pode também servir para agrupar as P. em ribossomais, microssomais, mitocondriais, lisossomais, citossólicas, membranares, etc. A electroforese tem sido utilizada em Bioquímica clínica e diagnóstico ao longo de várias décadas, para diferenciar as P. individuais do soro sanguíneo ou do fluido cerebrospinal. A migração electroforética das P. presentes nestes fluidos permitiu a sua classificação em pré-albumina, albumina e globulinas α_1 , α_2 , β_1 , β_2

e γ . As P. são, no entanto, mais comumente classificadas quanto à sua solubilidade, quanto à sua conformação, quanto à sua composição e quanto à função que desempenham.

Quanto à solubilidade, as P. podem subdividir-se em sete grupos:

A) *Albuminas* — São solúveis na água e em soluções salinas, coagulam pelo calor e precipitam por acção de uma solução saturada de sulfato de amónio. Exemplos de albuminas são a albumina do soro sanguíneo, a ovalbumina da clara do ovo, a α -lactalbumina do leite e a enzima β -amilase das sementes dos cereais em germinação.

B) *Globulinas* — Praticamente insolúveis na água, dissolvem-se em soluções salinas diluídas [p. ex., NaCl a 5% (m/v)] ou em soluções diluídas de ácidos e álcalis fortes, sendo precipitadas por uma solução 50% saturada de sulfato de amónio. Os anticorpos (imunoglobulinas) são exemplos de globulinas animais; nas plantas, muitas P. de reserva de sementes são globulinas — são os casos, p. ex., das conglutinas dos tremoços, da vicilina e da legumina da ervilha, da edestina das sementes do cânhamo, da excelsina da castanha-do-pará, da araquina e da conaraquina do amendoim e da enzima α -amilase.

C) *Prolaminas* — Insolúveis em água e álcool etílico absoluto, mas solúveis em etanol a 70-80% (v/v). Muitas P. de reserva dos cereais são prolaminas, como são os casos da gliadina do trigo e da zeína do milho.

D) *Glutelinas* — São apenas solúveis em ácidos e álcalis diluídos. São exemplos destas P. as glutelinas α e β das sementes do trigo.

E) *Escleroproteínas (albuminóides)* — São apenas solúveis em soluções concentradas de ácidos e álcalis fortes. São as P. fibrosas que têm funções de suporte ou de protecção nos tecidos animais, como o colagénio da pele, tendões e ossos, as elastinas dos tendões e artérias, e as ceratinas dos cabelos, unhas, lã, cornos e cascos.

F) *Histonas* — P. básicas (pontos isoeléctricos compreendidos entre 7,5 e 10,8) solúveis na água, mas que precipitam em soluções diluídas de amónia. Ocorrem nos núcleos celulares, em associação com os ácidos nucleicos.

G) *Protaminas* — Mais básicas (pontos isoeléctricos compreendidos entre 11,7 e 12,1) e mais simples que as histonas, são solúveis na água, não coagulam pelo calor, mas precipitam por acção do etanol. Têm também sido encontradas em associação com ácidos nucleicos, no esperma de peixes.

Esta é uma classificação antiga, em que cada uma das classes é, muitas vezes, mal definida. P. ex., o espectro de solubilidade entre albuminas e globulinas é quase contínuo, o que torna por vezes difícil classificar determinadas P. numa ou noutra classe.

Quanto à forma ou estrutura, podem ser agrupadas em *P. fibrosas* e *P. globulares*. Nas primeiras, a sua conformação nativa é essencialmente conseguida à custa das estruturas de nível primário e secundário. São normalmente insolúveis em água e em soluções salinas. Apresentam estruturas moleculares muito distendidas, com um grau elevado de simetria molecular. São geralmente P. com funções estruturais, muito estáveis

na presença de ácidos e bases e resistentes à proteólise. São exemplos de P. fibrosas o colagénio, o α -ceratina, o β -ceratina, a fibroína, a miosina, a tropomiosina, a gelatina, o fibrinogénio e a elastina. As P. globulares apresentam uma forma esférica-elipsóidica devida à estrutura de nível terciário bem definida que as caracteriza, sendo solúveis em água e soluções salinas diluídas. São as P. biologicamente mais activas (enzimas, hormonas, anticorpos, etc.), que possuem uma conformação globular. É nestas P. que as cadeias polipeptídicas mais se enrolam e dobram sobre si mesmas. São exemplos típicos as albuminas, globulinas, protaminas, histonas, prolaminas e glutelinas.

Quanto à composição, as P. podem agrupar-se em *P. simples* ou *não-conjugadas* e em *P. conjugadas*. As P. simples são constituídas exclusivamente por resíduos de aminoácidos, i. é, por hidrólise libertam apenas aminoácidos. As P. conjugadas são as P. que contêm na sua composição outras substâncias de natureza não-peptídica para além dos aminoácidos, i. é, por hidrólise libertam aminoácidos e outros compostos orgânicos e/ou inorgânicos. Dentro destas temos a considerar as fosfoproteínas, contendo fósforo (p. ex.: caseína do leite, vitelina da gema do ovo), as lipoproteínas, contendo lípidos, as glicoproteínas, contendo hidratos de carbono (p. ex.: mucinas e mucóides), as flavoproteínas, contendo flavina, as hemoproteínas, contendo grupos heme (p. ex.: hemoglobina e mioglobina), as metaloproteínas, contendo metais (Zn, Mn, Fe, Cu, Co, V, etc.) (p. ex.: hemocianinas, ferredoxinas, plastocianinas), as nucleoproteínas, contendo ácidos nucleicos, e as cromoproteínas, contendo grupos prostéticos coloridos (as hemoproteínas são um caso particular das cromoproteínas). As P. podem ainda ocorrer em associação com diversos outros tipos de compostos, de que são exemplos terpenos, clorofilas, carotenóides, ficobilinas e uma variedade de grupos prostéticos e de coenzimas.

As P. podem ainda ser classificadas em função do papel biológico que desempenham.

a) *Catálise* — A grande maioria das enzimas conhecidas são P. Praticamente todas as reacções químicas em que participam biomoléculas orgânicas nas células são catalisadas por enzimas. Foram já descobertos vários milhares de enzimas, cada uma das quais catalisa, de modo mais ou menos específico, um tipo diferente de reacção química. Exemplo: álcool desidrogenase.

b) *Função hormonal ou de regulação* — Algumas P. estão envolvidas na regulação da actividade celular ou fisiológica. É o caso, p. ex., de muitas hormonas, como sejam a insulina e a glucagina. A resposta celular a muitos sinais hormonais é muitas vezes mediada pelas chamadas P. G. Outras P. regulatórias ligam-se ao DNA e regulam a biossíntese de enzimas e a transcrição.

c) *P. contrácteis* — Actina, miosina e tropomiosina dos músculos, tubulina e dineína dos cílios e flagelos, são responsáveis pelo movimento dos organismos vivos.

d) *P. de resposta a stresses*, abióticos (p. ex.: P. de choque térmico) e bióticos (p. ex.: P. PR, do inglês *Pathogenesis Related*).

e) *P. de membrana* — Envolvidas no transporte activo, que determinam a concentração intracelular de muitos metabolitos. P. ex.: ATPases, canais iónicos, rodopsina.

f) *P. nucleares* — P. ex.: histonas.

g) *P. estruturais com funções de revestimento* — α - e β -ceratinas dos pêlos, lã, cabelos, penas, pele, unhas, cascos, bico de aves, chifres, etc.

h) *P. estruturais com funções de suporte* — Colagénio das cartilagens, tendões e couro dos animais, reticulina, cristalina, elastina dos ligamentos, resilina das asas dos insectos.

i) *Regulação genética* — Factores de transcrição.

j) *Constituintes de estruturas naturais* — P. ex.: fibroína da seda dos casulos dos insectos e teia das aranhas.

k) *Reserva e armazenamento* — Ovalbumina da clara do ovo, vitelina da gema do ovo, lactalbumina e caseína do leite, gliadina das sementes de trigo, zeína das sementes de milho, vicilina e legumina das sementes de ervilha, ferritina que armazena ferro.

l) *Transporte* — A hemoglobina transporta oxigénio no sangue dos animais vertebrados; a albumina do soro transporta ácidos gordos e muitas outras substâncias, incluindo hormonas, drogas, etc.; a transferrina transporta ferro; a ceruloplasmina transporta cobre; as lipoproteínas do plasma sanguíneo transportam lípidos; algumas P. membranares estão envolvidas no transporte através das membranas de glucose, aminoácidos e outras substâncias.

m) *Defesa bioquímica* — P. ex.: anticorpos ou imunoglobulinas, P. do complemento, interferões, vários factores de coagulação do sangue; o fibrinogénio e a trombina, p. ex., participam na coagulação do sangue, evitando hemorragias quando ocorrem danos no sistema vascular; nas plantas, as P. relacionadas com a patogenicidade (P. PR), de que são exemplos a taumatina, a osmotina e as quitinases; também algumas P. presentes nos venenos de cobra, algumas toxinas bacterianas e P. tóxicas de plantas, como a ricina de sementes de *Ricinus* e a abrina de *Abus preicatorius* desempenham papéis defensivos.

n) *Como funções especiais de P.* podem citar-se as P. anticongelantes, presentes, p. ex., no plasma sanguíneo de alguns peixes do Antártico, e a lubrificação ou redução de atrito produzida por certas mucoproteínas existentes nas articulações dos animais. Do ponto de vista de interesse comercial, foram descobertas em frutos africanos duas P., a monelina e a taumatina, que são c. 100 000 vezes mais doces que o açúcar numa base molar e alguns milhares de vezes mais doces que o açúcar numa base de peso. Nenhuma contém hidratos de carbono ou aminoácidos raros.

3. *Estrutura* — A) *Hierarquias na estrutura das P.* — Dada a grande complexidade estrutural das moléculas das P., é frequente considerar, no seu estudo, quatro níveis de estrutura: as estruturas de nível primário, secundário, terciário e quaternário. Como níveis intermédios de estrutura podem referir-se a estrutura super-secundária e os domínios de estrutura. Acima da estrutura de nível quaternário podem encontrar-se níveis mais elevados de organização supramolecular: agregados de P. com diferentes funções

(p. ex.: ribossomas e complexos multienzimáticos); agregados macromoleculares com funções estruturais (p. ex.: os microtúbulos).

B) *Estrutura de nível primário* — É definida pela sequência de resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica. Essa sequência de aminoácidos é geneticamente determinada, pois está codificada no DNA. Considerando apenas a estrutura de nível primário, a cadeia polipeptídica não seria linear mas sim em zigzag, devido à natureza tetraédrica dos átomos de carbono α dos resíduos de aminoácidos. O esqueleto da cadeia polipeptídica forma um zigzag de planos contendo ligações peptídicas quase sempre na configuração *trans*. Ligações peptídicas na configuração *cis* são por vezes observadas quando a prolina é um dos aminoácidos participantes. Uma cadeia polipeptídica, tal como um \mathcal{N} péptido, apresenta duas extremidades distintas: uma extremidade contendo um grupo amina livre (a extremidade N ou NH_2) e uma extremidade contendo um grupo carboxilo livre (a extremidade C ou COOH). Por convenção, a sequência de resíduos de aminoácidos lê-se, escreve-se e numera-se a partir da extremidade N. Cada aminoácido da cadeia peptídica recebe a designação de resíduo: resíduo alanil ou de alanina, resíduo glicil ou de glicina, etc. Esta designação deriva da formação da ligação peptídica resultar da eliminação de uma molécula de água entre os grupos $-\text{COOH}$ e $-\text{NH}_2$ dos dois aminoácidos adjacentes. As forças contribuintes para a estrutura de nível primário são ligações covalentes.

C) *Estrutura de nível secundário* — O esqueleto covalente de uma cadeia polipeptídica contém ligações covalentes, as quais podem sofrer rotação. Seria assim de esperar que a cadeia pudesse assumir um número infinito de conformações possíveis e que a conformação da cadeia apresentasse modificação permanente em consequência da mobilidade térmica e da rotação casual de segmentos da cadeia em torno das ligações covalentes simples. Contudo, a cadeia polipeptídica de uma P. nativa possui apenas uma ou algumas conformações estáveis em condições biológicas normais, o que implica que as ligações covalentes do esqueleto das P. não podem sofrer rotação livre. Vários factores contribuem para a restrição à rotação em torno das ligações covalentes de uma cadeia polipeptídica: a) a primeira, de natureza termodinâmica, tem carácter geral — a cadeia procura sempre a conformação mais estável, i. é, a de menor nível energético, o que significa que algumas conformações são proibidas, enquanto que outras são muito favorecidas;

b) a ligação peptídica é rígida e planar, o que faz com que as únicas rotações permitidas numa cadeia polipeptídica sejam as que envolvem rotações em torno das ligações covalentes simples formadas pelos átomos de carbono α ;

c) a presença dos grupos laterais R dos resíduos de aminoácidos, que impõem restrições de natureza espacial;

d) as forças responsáveis pela manutenção das estruturas de nível secundário, terciário e quaternário.

A estrutura de nível secundário das P. refere-se à regularidade espacial de sequências de resíduos de aminoácidos. As forças contribuintes para

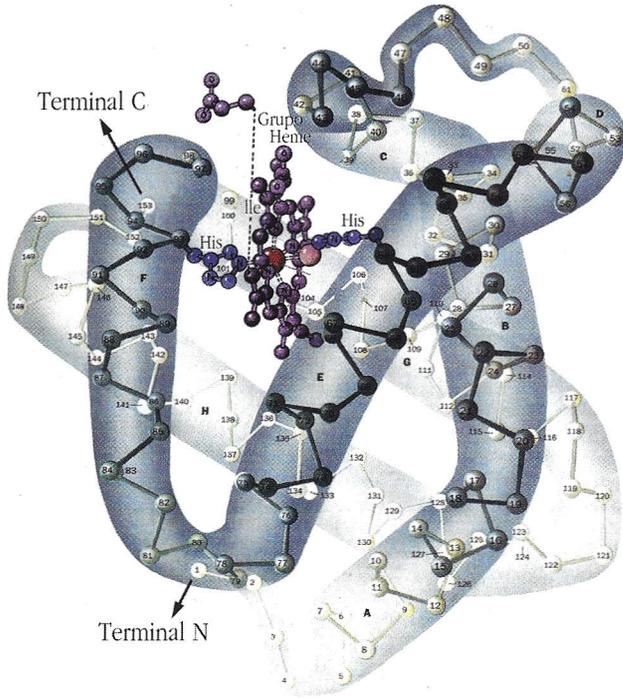
este nível de estrutura são as ligações de hidrogénio e as forças electrostáticas (Hélice α). A ligação de hidrogénio é a principal força de estabilização da estrutura de nível secundário das P. Os grupos N-H e C=O do esqueleto central da cadeia polipeptídica têm tendência para actuar entre si por ligações de hidrogénio. A grande extensão da cadeia polipeptídica, bem como a sua grande maleabilidade, favorecem a aproximação daqueles grupos, estabilizando a estrutura de nível secundário pela formação de liga-

ções de hidrogénio. As forças electrostáticas têm também, em alguns casos, algum efeito estabilizador na estrutura de nível secundário das P. Os dois tipos principais e de ocorrência mais frequente de estruturas de nível secundário são a hélice α e a folha pregueada β . Outros tipos destas estruturas, de ocorrência menos comum, são a hélice 3_10 e a hélice π , as curvaturas β e γ , a saliência β , os ganchos β , etc.

D) *Estrutura supersecundária* — Consiste numa série de elementos da estrutura de nível secundário, ligados sequencialmente, não constituindo, no entanto, a estrutura de nível terciário completa ou um domínio da molécula. As estruturas supersecundárias podem funcionar como unidades de enrolamento, i. é., durante o enrolamento de uma P. complexa, podem atingir-se passos de estabilidade energética através da formação de estruturas supersecundárias. Os tipos de estrutura supersecundária observados mais frequentemente são a $\alpha\alpha$ (duas hélices α antiparalelas), $\beta\alpha\beta$ (talvez o tipo mais comum, consistindo numa hélice α entre dois segmentos de cadeia que formam uma folha pregueada β paralela), e $\alpha\beta\beta$ ou $\beta\beta\alpha$ (menos frequentes, consistindo de uma hélice α antes ou depois de dois segmentos de folha pregueada β antiparalelos). Uma série de estruturas supersecundárias podem formar um domínio de estrutura (p. ex.: o domínio 1 da piruvato cinase) ou uma P. (p. ex.: a triose-fosfato isomerase).

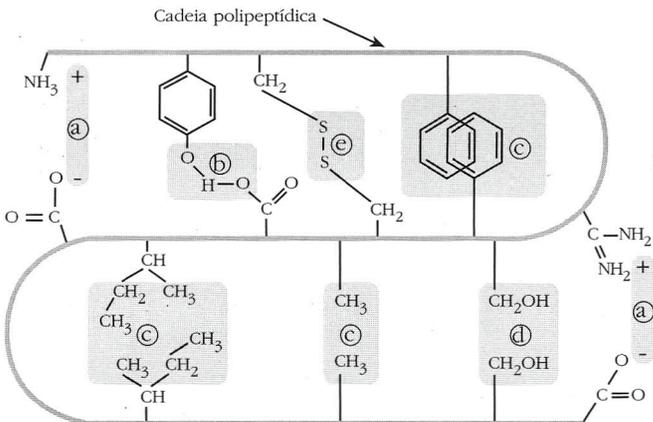
E) *Estrutura de nível terciário* — Uma vez que as P. fibrosas são bastante alongadas, a sua conformação é predominantemente conseguida à custa das estruturas de nível primário e secundário. O mesmo não sucede com as P. biologicamente mais activas (enzimas, anticorpos, hormonas, etc.), de conformação globular. Nestas P., as longas cadeias polipeptídicas (com estrutura de nível secundário do tipo helicoidal ou outro) encontram-se intensamente dobradas e enroladas sobre si mesmas, originando moléculas com conformações complexas e compactas. Estes enrolamentos e dobras constituem, no seu conjunto, a estrutura de nível terciário da P., e resultam de interações várias que se estabelecem entre as cadeias laterais R dos resíduos de aminoácidos. Cinco tipos de forças mantêm a estrutura de nível terciário das P.: ligações de persulfureto, ligações de hidrogénio, forças electrostáticas, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas. Com excepção das ligações de persulfureto, que são ligações covalentes, todas as outras forças são relativamente fracas, o que torna a estrutura de nível terciário das P. relativamente lábil.

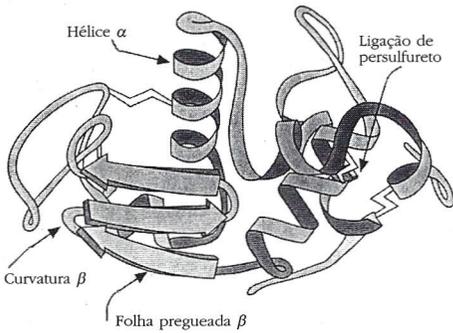
a) *Ligações de persulfureto* — Não são de ocorrência comum nas P. intracelulares, sendo mais frequentes nas P. excretadas das células, como as P. dos fluidos extracelulares, e nas P. da superfície das células — são, por isso, mais comuns nas P. de origem animal do que nas P. de origem vegetal. É fácil de compreender a razão porque estas ligações ocorrem mais frequentemente nas P. extracelulares — estas estão mais sujeitas a um meio variável, no que diz respeito a pH, temperatura, etc., e as ligações de persulfureto são as únicas ligações fortes que contribuem para estabilizar a estrutura de nível terciário. O estabelecimento das ligações de persulfureto



Representação da estrutura de nível terciário da mioglobina de esperma de baleia. Os resíduos de aminoácidos encontram-se numerados consecutivamente a partir do terminal N. As oito hélices estão designadas pelas letras A a H

Representação dos cinco tipos de ligações que estabilizam a estrutura de nível terciário das proteínas. (a) Forças electrostáticas; (b) ligações de hidrogénio; (c) interações hidrofóbicas; (d) forças de Van der Waals; (e) ligações de persulfureto





Representação esquemática da lisozima, com os seus diversos tipos de estruturas de nível secundário. A cadeia polipeptídica está representada sob a forma de uma fita

processa-se durante o enrolamento da cadeia polipeptídica, após a tradução, e pode ocorrer espontaneamente ou ser catalisado por uma enzima — a P. bissulfeto isomerase (PBI). As ligações de persulfureto não dirigem nem comandam o enrolamento espontâneo e termodinâmico das P. Contudo, uma vez adquirida a estrutura de nível terciário, ela é estabilizada pela formação de ligações de persulfureto. I. é, as ligações de persulfureto são importantes na estabilização da estrutura de nível terciário, não exercendo influência na aquisição de tal estrutura.

b) Ligações de hidrogénio — Estas ligações desempenham um papel muito importante na estrutura das P., particularmente na de nível secundário. Em geral, todas as potencialidades de formação de ligações de hidrogénio são satisfeitas. Deste modo, os grupos carbonilo e amida do esqueleto central da cadeia polipeptídica participam em ligações de hidrogénio ou da estrutura de nível secundário, ou com a água do meio circundante, ou com uma cadeia lateral R polar de um resíduo de aminoácido. Por outro lado, há também formação de ligações de hidrogénio entre cadeias laterais R polares de resíduos de aminoácidos entre si e com a água. A ligação de hidrogénio forma-se ou resulta da atracção electrostática entre um átomo de hidrogénio, com uma carga eléctrica residual positiva, e um átomo electronegativo, com uma carga eléctrica residual negativa (p. ex.: O, N, S, F). A energia livre de formação de uma ligação de hidrogénio é de c. -5 kcal.mol^{-1} . Como as contribuições das ligações de hidrogénio para a estabilidade de uma P. são aditivas, este tipo de ligação pode ser um factor importante na estabilidade destes polímeros.

É difícil estimar com rigor o valor da contribuição das ligações de hidrogénio para a estabilização da estrutura de nível terciário. Considerando a P. no estado desdoblado, os grupos polares internos da cadeia polipeptídica podem formar, em alternativa, ligações de hidrogénio com a água do meio circundante. Haverá assim, em termos líquidos, pouco ou nenhum ganho de estabilidade quando a P. passa do estado desdoblado à sua conformação nativa, se considerarmos apenas as ligações de hidrogénio. Provavelmente, não são também as ligações de hidrogénio que, tal como as ligações de persulfureto, dirigem ou comandam a aquisição da

estrutura de nível terciário. No entanto, a conversão da forma desenrolada da cadeia polipeptídica na forma enrolada, ou vice-versa, envolve o rompimento de muitas ligações de hidrogénio com um número equivalente a reestabelecer-se posteriormente. As ligações de hidrogénio devem ser, por isso, importantes na estabilização da estrutura de nível terciário. Por outro lado, foi demonstrado que, por razões de natureza entrópica, as interacções intramoleculares originam maior estabilidade que as interacções intermoleculares, sugerindo que a contribuição das ligações de hidrogénio pode ser substancial na estabilização da forma nativa da P.

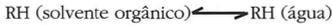
c) Interações electrostáticas — São forças atractivas que se estabelecem entre cadeias laterais R de resíduos de aminoácidos com cargas eléctricas opostas — p. ex. entre o grupo amina ϵ de um resíduo de lisina ($-\text{NH}_3^+$) e o grupo carboxilo β do ácido aspártico ($-\text{COO}^-$). Estas interacções são também designadas por pontes salinas (do inglês *salt bridges*). A força atractiva entre duas cargas eléctricas opostas é dada por

$$F = \frac{e_1 e_2}{D r^2}$$

em que e_1 e e_2 são as cargas eléctricas de iões, r a distância entre eles e D a constante dieléctrica do meio. F e D estão negativamente correlacionados. A água, com uma constante dieléctrica muito elevada ($D = 80$, a 20°C) tende a opor-se à atracção electrostática entre os iões de carga eléctrica oposta. Por este motivo, o valor de F para uma solução aquosa de NaCl, p. ex., é pequeno, e os iões Na^+ e Cl^- dissolvem-se prontamente na água. O mesmo não acontece se se tratar do benzeno, com um valor de $D = 2,3$ a 20°C . O facto de não se saber, com precisão, o valor de D do meio celular torna difícil avaliar a contribuição dada pelas interacções electrostáticas para a estabilidade da estrutura de nível terciário. A elevada constante dieléctrica da água sugere, no entanto, ser pequena tal contribuição, embora se saiba que este tipo de forças desempenha um papel importante a nível da função de muitas P.

d) Forças de Van der Waals — Estas ligações estabelecem-se quando moléculas ou grupos de átomos se encontram muito próximos uns dos outros (distância inferior a $0,4 \text{ nm}$ no caso das P.). São originadas nos dipolos infinitesimais gerados em todos os átomos pelo movimento dos electrões em torno do núcleo. Resultam, por isso, de flutuações locais da densidade electrónica dos átomos. Podem também ser induzidas pela presença de um dipolo na vizinhança. São, por isso, forças atractivas que resultam de interacções entre dipolos. São, assim, possíveis vários tipos de interacções: dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido e dipolo induzido-dipolo induzido. São forças que se estabelecem entre cadeias laterais R não polares de resíduos de aminoácidos. Individualmente, as forças de Van der Waals são muito fracas — c. $0,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$, c. 200 vezes mais fracas que uma ligação covalente típica e 40 a 50 vezes mais fracas que uma ligação de hidrogénio. Contudo, estas ligações são muito numerosas e aditivas nas P., o que pode fazer com que a sua contribuição seja considerável para a estrutura de nível terciário destes polímeros.

e) *Interações hidrofóbicas* — Considere-se o caso da transferência de um hidrocarboneto de um solvente orgânico para a água:



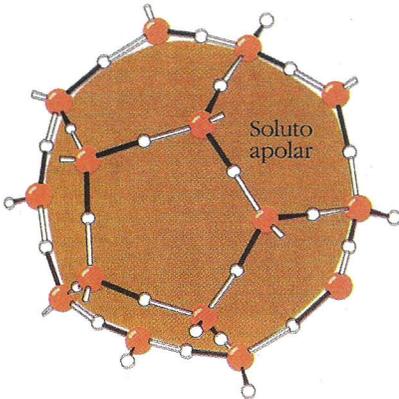
Sabendo que $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, em que ΔG , ΔH e ΔS representam, respectivamente, as variações de energia livre, entalpia e entropia e T é a temperatura absoluta, podem-se calcular os seguintes valores relativamente à passagem do metano do benzeno para a água:



$$\begin{aligned} \Delta H &= -2,8 \text{ kcal.mol}^{-1} \\ \Delta S &= -18,0 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1} \\ T\Delta S &= -5,4 \text{ kcal.mol}^{-1} \\ \Delta G &= +2,6 \text{ kcal.mol}^{-1} \\ K_{\text{eq}} &= 1,24 \times 10^{-2} \end{aligned}$$

Um hidrocarboneto é muito pouco solúvel em água, em virtude das moléculas de água serem polares, estabelecendo entre si ligações de hidrogénio, ausentes no hidrocarboneto.

Como era de esperar, a transferência do hidrocarboneto para a água origina um valor de $\Delta G > 0$ e $K_{\text{eq}} \ll 1$, uma vez que os hidrocarbonetos são insolúveis em água. Além disso, $\Delta H < 0$ (o processo é exotérmico), i. é., o valor positivo de ΔG resulta de ΔS ser muito desfavorável. Quando o hidrocarboneto apolar entra na fase aquosa, as moléculas de água «deslocadas» pela introdução daquela molécula formam uma gaiola à volta do hidrocarboneto, de tal modo que se orientam no sentido de formarem um número máximo de ligações de hidrogénio, número esse inferior ao número de ligações de hidrogénio que se estabelecem na água pura.



Gaiola de água, ilustrando a orientação preferencial das moléculas de água em torno de uma molécula de um soluto apolar. A fim de maximizarem a capacidade de formação de ligações de hidrogénio, as moléculas de água tendem a «escarranchar-se» sobre o soluto inerte de modo a que duas ou três das suas direcções tetraédricas fiquem dispostas tangencialmente à sua superfície. Isto permite que elas estabeleçam ligações de hidrogénio com as moléculas de água vizinhas que estão em contacto com o soluto. Esta estrutura de moléculas de água estende-se por diversas camadas para além da primeira cobertura de hidratação do soluto apolar

As moléculas de água em torno de uma molécula de hidrocarboneto encontram-se muito mais ordenadas e mais estruturadas do que noutra

ponto da solução (onde se podem movimentar mais livremente, formar e quebrar ligações de hidrogénio, etc.), de tal modo que a entropia do sistema diminui com a formação da gaiola de água, i. é., se

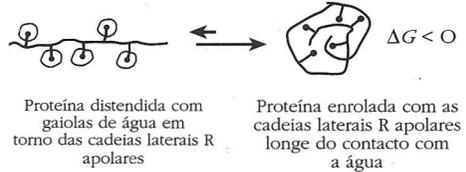
$$\Delta S < 0 \Rightarrow \Delta G \nearrow \Rightarrow$$

\Rightarrow processo termodinamicamente desfavorável. Daí a tendência dos hidrocarbonetos para «fugirem» do contacto com a água, i. é., serem hidrofóbicos.

No caso das P., estas considerações implicam que as cadeias laterais *R* não-polares (hidrofóbicas) tendem a localizar-se no interior das moléculas, o mais longe possível da água. Se imaginarmos uma P. distendida, tal como acontece quando está a ser sintetizada, o seu enrolamento para formar a estrutura compacta será movido por um aumento da entropia

$$(\Delta S > 0 \Rightarrow \Delta G < 0 \Rightarrow \text{processo espontâneo})$$

causado pela libertação das moléculas de água das gaiolas que se formam em torno dos grupos *R* apolares.



Note-se que a estabilidade global da estrutura «dobrada» em relação à «desdobrada» é bem mais pequena do que seria de esperar a partir da energia de estabilização hidrofóbica. Esta diferença pode ser explicada pelo facto de ser desfavorável, em termos de entropia, a conversão de uma cadeia polipeptídica desdobrada, altamente flexível, numa cadeia dobrada, compacta e bem mais ordenada. Por outras palavras, o estado desenrolado da P. caracteriza-se por um grau elevado de entropia de conformação, bem como por numerosas ligações de hidrogénio estabelecidas entre muitos grupos da P. e as moléculas de água do meio circundante, o que tende a manter a P. no estado desenrolado.

Deste modo, o enrolamento da cadeia polipeptídica para tomar a sua conformação tridimensional nativa leva a grande maioria das cadeias laterais *R* apolares para o interior, onde têm um contacto mínimo com a água. Simultaneamente, as cadeias laterais *R* polares tendem a manter-se à superfície da P., onde interactivam intensamente com as moléculas de água do meio circundante. São, portanto, as interações hidrofóbicas (factor de natureza entrópica) que mais contribuem para a aquisição da estrutura de nível terciário das P.

F) *Domínios de estrutura* — São porções contíguas de uma cadeia polipeptídica que adquirem frequentemente a estrutura de nível terciário (i. é., se enrolam) em unidades locais compactas. Constituem um nível de complexidade estrutural entre as estruturas de nível secundário e terciário das P. Se uma P. tiver mais de um domínio, os domínios adquirem a estrutura de nível terciário separadamente e o último passo no «enrolamento» da cadeia polipeptídica é a asso-

cação dos domínios. Por vezes, os domínios de uma P. são muito diferentes, como acontece com a piruvato cinase; no entanto, frequentemente, eles são semelhantes, como é o caso da rodanese. A separação entre os domínios de uma cadeia polipeptídica varia desde domínios globulares independentes, ligados apenas por uma porção flexível de cadeia polipeptídica, até domínios em contacto directo com as suas superfícies. A dimensão mais comum dos domínios é conterem entre 100 e 200 resíduos de aminoácidos — contudo, conhecem-se domínios contendo desde 40 a mais de 400 resíduos de aminoácidos.

A existência de domínios tem algumas vantagens biológicas. É importante na simplificação do processo de enrolamento da cadeia polipeptídica, i. é., na aquisição da estrutura de nível terciário das P., de tal modo que este enrolamento se pode processar em passos pequenos e separados, principalmente no caso de P. grandes. Outra função importante dos domínios é a de permitir o movimento relativo de partes da cadeia polipeptídica. Movimentos totalmente flexíveis seria impossível entre as subunidades de uma P. oligomérica, uma vez que elas se dissociariam, mas são possíveis entre domínios, que estão unidos por ligações covalentes. Um certo grau de flexibilidade entre domínios é a muitas vezes crucial na ligação de enzimas a substratos, no controlo alostérico e na montagem de estruturas complexas. Na enzima glicolítica hexocinase, p. ex., os dois domínios de cada subunidade convergem um para o outro após ligação à molécula da glucose, cercanda-a completamente, de tal modo que a ligação da glucose se processa num ambiente que exclui a água como um substrato competitivo:



Hexocinase Glucose Complexo hexocinase-glucose

Os domínios podem assim ser encarados como unidades funcionais dentro da P.: muitos centros activos de enzimas ocorrem na interface de domínios; no caso de enzimas com mais de um substrato, os diferentes centros de ligação ocorrem normalmente em domínios distintos; no caso de P. com mais de uma função, domínios distintos executam geralmente funções diferentes.

Um domínio de uma P. pode ocorrer em P. bastante diferentes. O domínio de ligação do NAD, p. ex., tem sido encontrado em todas as desidrogenases dependentes do NAD cuja estrutura foi determinada. Esta observação levou à proposta de uma evolução divergente a partir de uma estrutura ancestral comum, cujo gene teria sido copiado e fundido com uma variedade de genes diferentes.

G) *Estrutura de nível quaternário* — Refere-se ao arranjo das subunidades individuais quando a P. é constituída por mais de uma subunidade (P. oligomérica). Subunidade é a unidade proteica mais pequena cujos constituintes estão unidos por ligações covalentes. Deste modo, uma subunidade (monómero) pode consistir de uma única cadeia polipeptídica ou de duas ou mais cadeias unidas entre si por ligações de persulfu-

reto. A quimotripsina, p. ex., é uma P. monomérica porque as suas três cadeias polipeptídicas estão unidas por ligações covalentes. As subunidades de uma P. oligomérica podem ser todas iguais (estrutura de nível quaternário homogénea) ou de mais de um tipo (estrutura de nível quaternário heterogénea).

A facilidade com que as P. oligoméricas se dissociam nas suas subunidades, por acção de agentes desnaturantes brandos, sugere que as forças envolvidas na associação das subunidades são fracas, de natureza não-covalente, como ligações de hidrogénio, forças electrostáticas, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas. A observação de que existe um número elevado de grupos não-polares nas superfícies de contacto das subunidades indica que as forças de Van der Waals e as interações hidrofóbicas são as principais responsáveis pela tendência que as subunidades exibem para se associarem. Deste modo, a associação das subunidades para a formação de P. oligoméricas é semelhante ao enrolamento da cadeia polipeptídica e à associação dos domínios para originar a estrutura de nível terciário de cada monómero. Tal como no caso da estrutura de nível terciário, a formação da estrutura de nível quaternário é um processo de natureza entrópica, sendo as interações hidrofóbicas a principal força motriz da sua formação.

O tamanho e a complexidade da estrutura de nível quaternário das P. varia muito. Na grande maioria dos casos, as P. oligoméricas formam agregados contendo um número par de subunidades. No entanto, são conhecidos alguns oligómeros constituídos por um número ímpar de subunidades. Uma das propriedades mais importantes de uma P. oligomérica é a sua simetria molecular. O tipo de estrutura de nível quaternário de ocorrência mais frequente é a composta por duas subunidades idênticas. As P. tetraméricas constituem o segundo maior grupo de P. oligoméricas.

A existência de P. com várias subunidades traz, pelo menos, três vantagens para a célula: confere propriedades adicionais de regulação da actividade catalítica das enzimas (efeitos alostéricos, cooperativos, etc.); a associação de tipos diferentes de subunidades num mesmo agregado permite a ocorrência de modificações nas propriedades catalíticas das enzimas, quer pela associação de subunidades com funções catalíticas diferentes quer pela associação de subunidades com funções de regulação; pode conferir maior estabilidade à molécula da P.

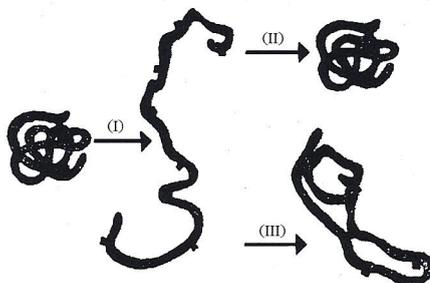
H) *Desnaturação das P.* — Nas condições fisiológicas, a forma dobrada e compactada das P. globulares, i. é., a sua forma nativa, é termodinamicamente mais estável que a forma desdobrada, mas apenas por uma pequena margem — da ordem de 5 a 15 kcal.mol⁻¹. Não admira, por isso, que, na maioria dos casos, as P. possam ser facilmente desdobradas (e dissociadas, no caso de serem oligoméricas) por várias condições. À perda da estrutura tridimensional chama-se desnaturação e os agentes que a provocam denominam-se desnaturantes. A desnaturação de uma P. pode ser detectada de diversos modos: por perda de actividade catalítica, no caso das enzimas; por alteração de parâmetros espectros-

Estrutura quaternária de algumas proteínas

Nome	Fonte	Massa molecular da proteína (Da)	Número de subunidades	Estrutura
Lisozima	Ovo de galinha	14 600	1	α
Malato desidrogenase	Fígado de rato	66 300	2	α_2
Lactose sintase	Leite de vaca	43 000	2	$\alpha\beta$
Ornitina carbamoiltransferase	Fígado de bovino	108 000	3	$\alpha_3(?)$
Gliceraldeído-fosfato desidrogenase	Músculo de coelho	144 000	4	α_4
Hemoglobina	Sangue de mamíferos	64 500	4	$\alpha_2\beta_2$
Lactato desidrogenase	Coração de porco	135 000	4	α_4 $\alpha_3\beta$ $\alpha_2\beta_2$ $\alpha\beta_3$ β_4
RNA polimerase	<i>Escherichia coli</i>	400 000	4	$\alpha_2\beta\gamma$
Nucleósido difosfocinase	Levedura	102 000	6	α_6
Luciferase	<i>Diplocardia longa</i>	300 000	6	$\alpha_2\beta_2\gamma_2$
Glicolato oxidase	<i>Lemna minor</i>	320 000	8	α_8
Nitrogenase	<i>Clostridium</i>	330 000	8	$\alpha_2\beta_4\gamma_2$
Arginina descarboxilase	<i>E. coli</i>	820 000	10	α_{10}
Glutamina sintetase	<i>E. coli</i>	592 000	12	α_{12}
Aspartato transcarbamoilase	<i>E. coli</i>	310 000	12	$\alpha_6\beta_6$
Isocitrato desidrogenase	Bovino	670 000	16	α_{16}
Ribulose bisfosfato carboxilase	Plantas superiores	530 000	16	$\alpha_8\beta_8$
Di-hidrolipoamida acetiltransferase	<i>E. coli</i>	960 000	24	α_{24}
Complexo piruvato desidrogenase	<i>E. coli</i>	5 000 000	72	$\alpha_{24}\beta_{24}\gamma_{24}$

cópicos; por modificação de propriedades como a solubilidade, etc. Devido ao modo como os diferentes agentes desnaturantes actuam sobre as P., a desnaturação de P. tem sido utilizada no estudo das forças responsáveis pela manutenção das estruturas de níveis terciário e quaternário. São exemplos de agentes desnaturantes as temperaturas elevadas, os valores extremos de pH, a adição de solventes orgânicos (p. ex.: álcool ou acetona) de detergentes (p. ex.: sulfato do decilo de sódio, desoxicolato de sódio, Triton X-100) ou de agentes caotrópicos (p. ex.: tricloroacetato), a utilização de concentrações elevadas de ureia ou de cloreto de guanidina e a aplicação de soluções salinas concentradas (p. ex.: de sulfato de sódio ou de sulfato de amónio). A passagem de uma P. do estado nativo ao estado desnaturado é uma passagem brusca, i. é., ocorre quase sempre abruptamente num pequeno intervalo de concentrações do agente desnaturante, de valores de pH ou de temperatura.

Diagrama ilustrando a desnaturação (I) de uma proteína, a sua completa renaturação (II) e a sua incompleta renaturação (III) (proteína biologicamente inactiva)

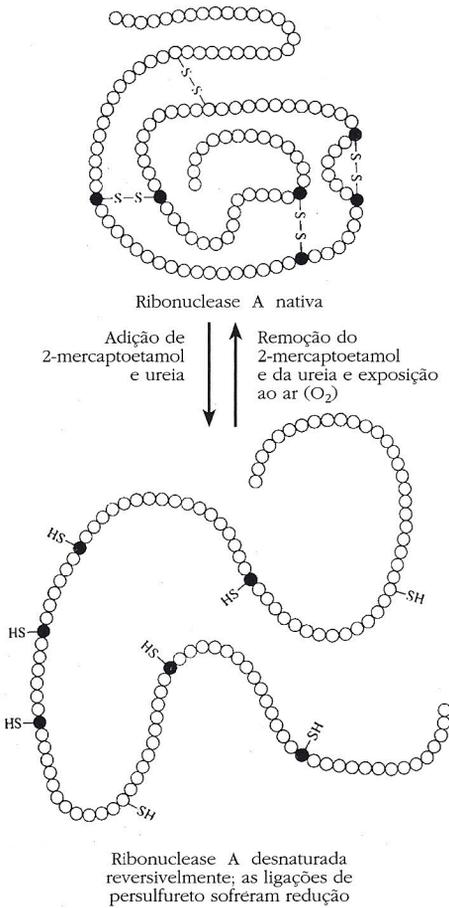


A desnaturação pode ser reversível ou irreversível, consoante se dê, respectivamente, a sua completa renaturação ou não, quando o agente desnaturante tiver sido removido (se a sua acção não tiver sido demasiado drástica).

D) *Enrolamento espontâneo das P.* — Poder-se-á perguntar como é que cada P., de um modo aparentemente infalível, se dobra e enrola para adquirir a sua conformação nativa e que corresponde à forma biologicamente activa. Consideremos o exemplo clássico da ribonuclease, uma enzima que hidrolisa as ligações fosfodiéster dos ácidos ribonucleicos. Esta enzima contém 124 resíduos de aminoácidos, incluindo oito resíduos de cisteína unidos por ligações de persulfureto. A adição de 2-mercaptoetanol (que quebra as ligações de persulfureto) e, em seguida, de 8 M de ureia desenrola completamente a ribonuclease. A subsequente remoção da ureia e do 2-mercaptoetanol por diálise, seguida de arejamento para restabelecer as ligações de persulfureto, regenera espontaneamente quase 100% da actividade enzimática original e, conseqüentemente, a conformação nativa. Para o restabelecimento espontâneo da estrutura nativa, as quatro ligações de persulfureto devem ser reformadas correctamente. A probabilidade disto acontecer aleatoriamente será dada por (há oito resíduos de cisteína)

$$\frac{1}{7} \times \frac{1}{5} \times \frac{1}{3} = \frac{1}{105}$$

Por outro lado, considerando a possibilidade de rotação em torno das ligações covalentes formadas pelos átomos de carbono α , o número de conformações possíveis é ilimitado. No entanto, a estrutura nativa restabelece-se espon-



Desnaturação e renaturação da ribonuclease A. Esta experiência demonstra que a informação necessária para o enrolamento da cadeia polipeptídica na conformação biologicamente activa está contida na sequência de resíduos de aminoácidos da proteína

taneamente: primeiro dá-se o enrolamento da molécula, depois a formação das ligações de persulfureto.

Esta experiência comprova a hipótese termodinâmica de Christian Anfinsen: a cadeia polipeptídica enrola-se porque a sua estrutura nativa é, em condições fisiológicas normais, mais estável do que a forma desenrolada. A estrutura de uma P. nativa é, deste modo, uma propriedade termodinâmica. Uma vez que a estrutura de nível terciário depende da natureza das interações entre as cadeias laterais *R* dos resíduos de aminoácidos na estrutura de nível primário, pode dizer-se que a estrutura de nível terciário é geneticamente determinada pela estrutura de nível primário, estando já codificada nos genes.

No processo de atingir o menor nível de energia, a cadeia polipeptídica tende a enrolar-se de tal modo que os resíduos hidrofóbicos ficam no interior da P., ao passo que os resíduos hidrofílicos tendem a ficar à superfície da P., em contacto com a fase aquosa do meio circundante, maximizando o número de ligações de hidrogénio estabelecidas. Uma excepção importante a esta regra ocorre nas P. que estão embebidas

nas membranas celulares, pois o interior destas estruturas é um meio altamente hidrofóbico. O segmento destas P. que atravessa a membrana expõe apenas cadeias laterais *R* hidrofóbicas, as quais ancoram a P. à membrana. Não se sabe ao certo se a estrutura nativa de uma P. corresponde ao seu nível mínimo de energia livre, ou apenas ao nível mais baixo possível sob condições fisiológicas.

Foi durante muito tempo aceite que o enrolamento e montagem de uma P. para aquisição da sua estrutura nativa era uma propriedade termodinâmica dessa P., especificada na sua estrutura de nível primário. A descoberta de algumas P. veio modificar, pelo menos em parte, este ponto de vista. É o caso, p. ex., da peptidil-prolil *cis-trans* isomerase, que catalisa a isomerização *cis-trans* de ligações peptídicas aminoacil-prolina, da P.-bissulfeto isomerase, que catalisa a formação de ligações de persulfureto, e dos chaperones moleculares, uma família de P. cuja função é a de assegurar o enrolamento correcto de algumas cadeias polipeptídicas e a sua montagem em estruturas oligoméricas; os chaperones moleculares não fazem parte da estrutura final da P. em cuja montagem participam, destinando-se, portanto, a evitar a formação de estruturas incorrectas. Assim sendo, algumas P. necessitam, para aquisição da sua estrutura nativa, de informação contida na sequência de resíduos de aminoácidos de outras P., como os chaperones moleculares.

4. «Turnover» de P. — O «turnover» de P. é hoje reconhecido como um componente importante na regulação dos sistemas biológicos. Este processo implica a ocorrência simultânea de síntese e de degradação de P. A grande maioria das P. de todas as células estão sujeitas a um «turnover» intenso, i. é, elas estão simultaneamente e continuamente a ser sintetizadas e degradadas, mesmo quando a sua concentração se mantém constante durante um dado período de tempo.

5. Síntese de P. — As P. são a expressão da informação genética. No núcleo das células eucariotas, o DNA é transcrito no mRNA. Este desloca-se para o citoplasma, onde a síntese de P. decorre nos ribossomas. De modo semelhante às células procariotas, também ocorre síntese proteica nos mitocôndrios e cloroplastos, pois estes organitos contêm toda a «aparelhagem» necessária à síntese das P., incluindo DNA, RNA e ribossomas.

Podem considerar-se, basicamente, cinco passos na síntese proteica [7] Proteínas (Síntese de): activação; iniciação; alongamento; terminação; processamento. O processamento ocorre ao nível do aminoacil-tRNA, da cadeia polipeptídica nascente ou da cadeia polipeptídica completa. Há vários tipos de processamento:

a) O enrolamento da cadeia polipeptídica, a associação de cadeias polipeptídicas entre si ou com ligandos, através de interações não-covalentes, para originar a conformação tridimensional nativa da P.

b) A modificação dos resíduos de aminoácidos proteicos, para originar os aminoácidos raros das P.

c) A ligação covalente de estruturas de natureza não-peptídica, como é o caso de hidratos de carbono, lípidos, ácidos nucleicos, grupos heme, etc.

d) A hidrólise da pró-sequência, uma sequência de resíduos de aminoácidos que pode ocorrer em qualquer parte da cadeia polipeptídica e que impede que a P. adquira a conformação nativa e, conseqüentemente, a expressão da sua actividade biológica. É importante, p. ex., durante o transporte e a montagem de certas P. Deste modo, muitas enzimas não são sintetizadas na sua forma cataliticamente activa, mas sim na forma de polipéptidos inactivos ou \mathcal{Z} imogénios, os quais são posteriormente activados por proteólise limitada. É o caso do tripsinogénio, quimotripsinogénio e pepsinogénio, os zimogénios das enzimas tripsina, quimotripsina e pepsina, respectivamente.

e) A hidrólise da pré-sequência ou péptido sinal. É uma sequência de resíduos de aminoácidos que ocorre normalmente na extremidade N da cadeia polipeptídica, sendo necessária para o trânsito da P. dentro da célula ou para a importação da P. por parte de organitos. Na realidade, a maior parte das P. presentes nos mitocôndrios e cloroplastos encontram-se codificadas no núcleo, sendo sintetizadas nos ribossomas do citoplasma sob a forma de precursores. O reconhecimento e a ligação da sua sequência sinal a um receptor específico presente na superfície do organito para o qual a P. se destina permite a importação da P., a qual é então processada proteoliticamente para o seu tamanho final.

6. Degradação de P. — A degradação de P. é um mecanismo integrante do processo mais geral de «turnover» e consiste na hidrólise enzimática das P. com libertação dos seus aminoácidos constituintes. As enzimas responsáveis pela hidrólise das ligações peptídicas que unem os resíduos de aminoácidos nas P. recebem a designação de \mathcal{Z} roteases. Tal como no caso da desintegração de isótopos radioactivos, a degradação de P. obedece a um modelo exponencial — assim, é possível definir semivida de uma P. como o período de tempo necessário para que sejam degradadas metade do número de moléculas de P. inicialmente presentes. De modo semelhante às taxas de síntese proteica, as taxas de degradação das P. são reguladas com precisão. A mesma P. poderá exibir semividas diferentes na mesma célula submetida a condições metabólicas distintas, ou em tecidos diferentes de um mesmo organismo. Por outro lado, existem mecanismos nas células que permitem regular a taxa global de degradação proteica.

A hidrólise de uma P. nos seus aminoácidos constituintes é um processo exergónico. Contudo, dentro da célula, tanto a síntese de P. como a sua degradação são energeticamente dispendiosas para a célula. Nestas condições, para que a degradação proteica não seja um processo exclusivamente dissipador de energia, terá de prover os organismos vivos com algumas vantagens selectivas:

a) Variações na concentração intracelular de P. podem ser conseguidas por uma alteração regulada das suas taxas de síntese, de degradação, ou de amibas — e quanto maiores forem essas taxas, maior o grau de controlo possível no teor da P. Neste sentido, observou-se que aquelas enzimas que limitam o fluxo de metabolitos através das vias metabólicas desenvolveram semividas particularmente curtas, de modo a que a sua

concentração intracelular possa flutuar rapidamente e com precisão em resposta a alterações ambientais.

b) O «turnover» contínuo de P. aumenta significativamente a capacidade do organismo se adaptar prontamente a alterações no seu meio ambiente. O processo de adaptação ocorre pela síntese de um conjunto de P. apropriado ao novo meio, assim como pela remoção daquelas que já não são necessárias. Esta adaptação é especialmente importante em condições de carência de nutrientes, as quais aceleram a degradação de P. para que as células passem a degradar as P. «de luxo» (funções celulares, como, p. ex., o crescimento e a divisão são consideradas de luxo em situações adversas em que a prioridade máxima é a sobrevivência), as quais vão fornecer os aminoácidos necessários à biossíntese das P. essenciais à sobrevivência.

c) As taxas de degradação das P. celulares variam também sob condições que afectam a fisiologia das células, tais como crescimento, diferenciação, etc. No caso das plantas, p. ex., a degradação das P. de reserva durante a germinação das sementes é um pré-requisito nutricional para a planta em desenvolvimento, ao passo que a degradação da P. foliar durante a senescência das folhas fornece aminoácidos que são exportados e armazenados de uma forma ou outra para reutilização no ciclo vegetativo seguinte.

d) A hidrólise rápida de P. com estruturas anómalas e potencialmente perigosas para as células, as quais podem ser produzidas em consequência de alguns stresses, como sejam temperaturas elevadas ou radiações que provoquem mutações ou erros na expressão genética.

e) Outra função fisiológica do catabolismo proteico resulta da utilização das P. e aminoácidos na gluconeogénese ou directamente como fonte de energia. Este aspecto assume especial importância nos animais, em situações de adaptação à falta de nutrientes, o que parece ocorrer à custa daquelas P. que não são essenciais à sobrevivência do organismo. No homem, p. ex., estima-se que, em condições normais, 15% da energia deriva do catabolismo dos aminoácidos. Aquele valor aumenta consideravelmente em condições de carência de nutrientes. As células apresentam vários sistemas de degradação de P., os quais parecem hidrolisar diferentes classes de P. ou manifestarem actividade apenas em certas condições fisiológicas ou em situações patológicas. Assim, existem:

a) *mecanismos de degradação não-lisossomais*, directamente dependentes do consumo de ATP, responsáveis pela maior parte do catabolismo altamente selectivo das P. intracelulares em condições metabólicas normais;

b) *mecanismos de degradação lisossomais* (vacuolares, no caso das células vegetais e de leveduras), responsáveis pela degradação proteica estimulada pelo stresse.

Como exemplos dos primeiros temos a via proteolítica dependente da \mathcal{Z} ubiquitina, bem como vias presentes nos mitocôndrios, cloroplastos e bactérias.

II PROTEÍNA A

Trata-se de uma P. da parede celular bacteriana, que ocorre em muitas linhas de *Staphylococcus aureus*, e que exhibe a capacidade de se ligar à

região F_c das imunoglobulinas G (IgG; ∇ Anticorpos), sem interferir com a formação do complexo antígeno-anticorpo. Ocorre predominantemente numa forma ligada covalentemente às peptidoglicanas da parede celular, com uma pequena proporção a ser excretada, sob a forma livre, para o meio de crescimento. Algumas linhas resistentes à metilina de *S. aureus* produzem apenas a forma livre. Uma das fontes mais ricas em P. A é a parede celular da linha Cowan I de *S. aureus*, a qual contém 6,7% (m/m) da P. A. P. A é normalmente purificada por digestão das bactérias com lisostafina, seguida de cromatografia de troca iónica, cromatografia por filtração em gel e cromatografia de afinidade em IgG-Sepharose.

A P. A é constituída por uma única cadeia polipeptídica, com uma massa molecular de 42 kDa, contendo poucos ou nenhuns hidratos de carbono, um resíduo C-terminal de lisina e um terminal N bloqueado. Não contém resíduos de triptofano nem de cisteína. Possui quatro domínios de estrutura com elevado grau de homologia (cada um contendo um resíduo de tirosina, que serve como centro de iodinação nas experiências de marcação radioactiva com ^{125}I) e um domínio C-terminal que se encontra ligado à parede celular.

A P. A liga-se às IgG de todos os mamíferos. Contudo, não se liga às IgG de aves e liga-se frouxamente às IgG dos animais ruminantes. Além disso, liga-se frouxamente às IgA, IgE e IgM de origem humana, não se ligando às IgG₃ e IgD. Estas características de ligação são utilizadas no isolamento e purificação das diferentes subclasses de IgG, as quais são eluídas separadamente de uma coluna contendo um gel de P. A-Sepharose pela aplicação de um gradiente contínuo de pH (∇ Cromatografia). Não se liga, de igual modo, aos receptores celulares para o F_c . A P. A é amplamente usada como reagente imunológico, frequentemente numa forma imobilizada, em colunas de cromatografia de afinidade, no isolamento e purificação de imunoglobulinas e, pela formação de complexos ternários, também de antígenos e de complexos anticorpo-antígeno. É ainda empregue como um reagente de ligação em imuno ensaios do tipo ELISA em histoquímica e em técnicas de transferência de P. (∇ blotting). A ^{125}I -proteína A (i. é, P. A marcada radioactivamente com o isótopo ^{125}I) é particularmente útil na detecção de anticorpos.

III PROTEÍNA AGP

∇ Proteoglicanas.

IV PROTEÍNA B

É uma P. da superfície celular de espécies de *Streptococcus* do grupo B, a qual se liga especificamente à região F_c das imunoglobulinas A (IgA; ∇ Anticorpos) de origem humana, sem afectar a sua capacidade de ligação ao antígeno. Não se liga a outras imunoglobulinas ou a P. do soro. É utilizada em imuno ensaios do tipo ELISA e em técnicas de transferência de P. (∇ blotting).

V PROTEÍNA C

É uma glicoproteína dependente da vitamina K, que é o ∇ zimogénio de uma endopeptidase de serina. Ocorre no plasma sanguíneo, onde limita a coagulação do sangue. Recebeu esta designação porque era eluída de colunas de ∇ cromatografia como o terceiro de quatro picos de

P. (denominados A, B, C e D). Apresenta uma massa molecular de 62 kDa no caso do homem e de 54,3 kDa no caso dos bovinos. No homem, o seu precursor é composto por 461 resíduos de aminoácidos (52,01 kDa).

A P. C é sintetizada a partir de um precursor, a autoprotrombina IIA, a qual é clivado numa cadeia polipeptídica leve e numa pesada. Estas cadeias são mantidas unidas por uma ligação de persulfureto na P. C. A trombina corta subsequentemente um tetradecapéptido do terminal N da cadeia polipeptídica pesada. Esta reacção, que decorre na superfície das células endoteliais, é fortemente promovida pela trombomodulina. A P. C é assim convertida na enzima P. C (activada), classificada com o número de cód. EC 3.4.21.69. Esta enzima contém 10 a 12 resíduos de γ -carboxiglutamilo nos 40 resíduos de aminoácidos da extremidade N-terminal.

A forma activada da P. C (i. é, com actividade enzimática) hidrolisa proteoliticamente e de modo específico o factor pro-acelerina (V_2) e o factor anti-hemofílico ($VIII_a$) (∇ Factores de coagulação do sangue), convertendo-os numa forma inactiva, funcionando como um factor anticoagulante potente. Esta reacção requer fosfolípidos, cálcio e a ∇ P. S. A importância fisiológica do papel desempenhado pelas P. C e/ou S é demonstrada pela observação de que indivíduos que não contêm uma destas P. morrem frequentemente na infância devido a hemorragias massivas.

VI PROTEÍNA DA CARNE

∇ Proteínas do músculo.

VII PROTEÍNA DOS CEREIAIS

As folhas, sementes, frutos e raízes das plantas contêm teores de P. que variam normalmente entre 2% e 25%. As plantas possuem, por isso, teores menores de P. que muitos produtos de origem animal. Tem mesmo sido sugerido que os cereais devem ser encarados primariamente como fontes de energia metabolizável e não como fontes de P. Contudo, os cereais são considerados excelentes fontes de P. porque produzem mais P. (5 a 9 vezes mais) por unidade de área agrícola do que os animais. Os custos energéticos associados à produção de P. (expressos em MJ/kg de P.) têm sido estimados em 30 para a soja, 65 para o milho, 300 para os ovos de galinha, 530 para o peixe, 585 para o leite, 590 para a carne de porco e 1300 para a carne de vaca. Infelizmente, as baixas concentrações de determinados aminoácidos nas plantas, em particular alguns aminoácidos essenciais, implica o consumo de grande quantidade de material vegetal para satisfazer as necessidades dietéticas do homem em P.

Em 1980, a produção mundial de P. totalizou 290 000 000 de t, 80% das quais foram de origem vegetal e apenas 20% de origem animal. Os cereais forneceram mais de dois terços das P. de origem vegetal. Os principais cereais cultivados a nível mundial são o trigo, o milho, o arroz, o centeio, a aveia, a cevada, o sorgo, o milho-painço e o triticale.

Do ponto de vista proteico, as sementes dos cereais são relativamente pobres. Em termos quantitativos, estas sementes contêm normalmente 8% a 16% de P. Em termos qualitativos, a P. destas sementes é fortemente deficitária em lisina. Além

disso, espécies diferentes apresentam pequenas deficiências em determinados aminoácidos. É o caso da cevada relativamente à isoleucina e treonina, do milho para o triptofano, da aveia e do arroz para a metionina, treonina e isoleucina, do centeio para a fenilalanina, isoleucina e triptofano, do sorgo para a metionina, triptofano e fenilalanina, e do trigo para a isoleucina e triptofano.

C. 80% da P. das sementes dos cereais está armazenada no endosperma. As P. do embrião são ricas em albuminas e globulinas e têm uma composição em aminoácidos relativamente equilibrada. As P. do endosperma são ricas em prolaminas e glutelinas. As glutelinas contêm ligeiramente mais lisina do que as prolaminas. O aumento do conteúdo proteico das sementes dos cereais por determinadas práticas culturais resulta de um aumento primário na fracção das prolaminas, o que reduz, por isso, o valor biológico da sua P.

O conteúdo proteico e a versatilidade funcional das sementes do trigo tornam-no apropriado para panificação (7) Proteínas do pão). O teor das suas sementes em P. varia normalmente entre 7,5% e 15%, o que depende da variedade e das condições ambientais em que cresce. Com excepção da lisina, para a qual é fortemente deficiente, a semente do trigo fornece P. em quantidade e qualidade razoáveis, quando se compara com o seu valor energético. A gliadina e a glutenina, que constituem o 7) glúten, correspondem a c. 82% do total de P. presente no endosperma da semente. Estas P. são particularmente ricas em glutamina e em prolina. A glutenina (20 a 100 kDa), que consiste de uma estrutura composta por subunidades unidas por ligações de persulfureto, é responsável pelas propriedades elástico-coesivas da massa do pão. As gliadinas (16 a 50 kDa) exibem propriedades elásticas e elasticidade baixa, contribuindo pouco para o volume da massa do pão.

As sementes do milho contêm c. 9% a 10% de P., a qual está localizada no embrião e no endosperma. As espécies de milho mais cultivadas são fortemente deficientes em lisina e triptofano. Contudo, algumas variedades mutantes apresentam teores mais elevados de lisina. As P. do endosperma do milho são compostas por 40% a 50% de zeína, uma prolamina, e 30% a 40% de glutelinas.

As sementes de aveia apresentam um teor em P. de 15% a 22%, o que é acompanhado por uma composição equilibrada em aminoácidos essenciais, incluindo a lisina e os aminoácidos sulfurados.

As sementes do arroz contêm, dependendo da variedade, 7,5% a 14% de P., ao passo que as de centeio possuem 11% a 12% e as de cevada 11 a 13%. O sorgo é uma fonte relativamente pobre de P., quando comparado com os outros cereais, devido a desequilíbrios na composição em aminoácidos e à sua baixa digestibilidade. Os teores em lisina e metionina são baixos. O papel do milho-painço como fonte de P. na alimentação humana é muito secundário na grande maioria dos países.

O triticale, um cereal híbrido produzido pelo homem, resulta do cruzamento do centeio com o trigo duro. Apresenta um teor em P. mais ele-

vado e uma composição em aminoácidos mais equilibrada que muitas espécies tradicionais de trigo.

VIII PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO

Abreviatura: hsp (do inglês *heat shock proteins*).

A generalidade das células dos organismos vivos, desde bactérias ao homem, respondem às temperaturas elevadas por um conjunto básico de três modificações no seu metabolismo proteico:

- há uma repressão (abrandamento ou mesmo paragem) da síntese das chamadas «house-keeping proteins», as P. ditas «normais» da célula;
- há um aumento generalizado na taxa global de degradação proteica, cujo objectivo é o de hidrolisar P., libertando os seus aminoácidos constituintes de modo a fornecer, o mais rapidamente possível (da rapidez da resposta pode depender a sobrevivência), os precursores necessários para

c) a síntese das P. de choque térmico.

Este fenómeno foi primeiramente observado na mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*. Quando células de *Drosophila* são transferidas da temperatura normal de crescimento (25°C) para 37°C, a síntese proteica normal pára e tem início a síntese das hsp. Por definição, as hsp são as P. cuja síntese é rápida e dramaticamente induzida a temperaturas elevadas. Podem, pois, ocorrer em condições fisiológicas normais. Assim, muitos membros da família das hsp estão normalmente presentes em todas as células. São, por isso, sintetizadas por células procariotas e eucariotas (incluindo bactérias, leveduras, células vegetais e células animais) após uma exposição a uma temperatura superior ao normal. Outros stresses, como tratamento com etanol, metais pesados ou anoxia, permitem a síntese de um conjunto de P. muito semelhante ao das hsp. A observação de que a resposta dos organismos à temperatura elevada é universal (tem sido encontrada em todos os organismos estudados, desde bactérias a plantas e animais, em quase todas as células e tecidos dos organismos multicelulares e em culturas de tecidos e de células) e tem sido muito conservada ao longo da evolução (p. ex., as hsp de *Escherichia coli* e do homem exibem uma homologia superior a 50% no que se refere às suas estruturas de nível primário) sugere que desempenha um papel fundamental na sobrevivência dos organismos às temperaturas elevadas e, possivelmente, ao stress em geral. Admite-se que estas P. permitem que as células façam os ajustamentos estruturais e bioquímicos que são necessários para que possam sobreviver ou tolerar a situação adversa imposta pelo stress. Têm sido localizadas hsp em várias fracções subcelulares, incluindo núcleo, mitocôndrio, cloroplasto, ribossoma e fracção solúvel da célula.

As P. de choque térmico são classificadas em famílias, de acordo com o seu tamanho. Como a sua identidade é, na maioria dos casos, desconhecida, as P. de choque térmico são referidas individualmente pela sigla hsp, seguida do número que representa a sua massa molecular em kDa (p. ex.: hsp27, hsp60, hsp70). Podem ser consideradas quatro famílias principais de hsp: o grupo das hsp grandes, com tamanhos desde 68 kDa a mais de 100 kDa; um grupo de tamanho intermédio; a família de hsp de massa mo-

lecular baixa, com c. 15 a 27 kDa, mais ou menos exclusiva das plantas; a 7ubiquitina (8,6), presente nas células eucariotas. Há diferenças significativas entre células animais e vegetais no que respeita à abundância relativa de hsp de massa molecular baixa e alta. Nas células animais, há um predomínio de hsp na zona dos 70 kDa, ao passo que nas células vegetais, a maior parte da síntese das hsp está centrada na produção da família de hsp de massa molecular baixa.

Experiências realizadas com plântulas de soja (*Glycine max*) mostraram que, quando a temperatura é bruscamente elevada de 28-30°C para 35-45°C, ocorre síntese de hsp. A 40°C, as hsp constituem a maioria das P. sintetizadas de novo. Contudo, acima dos 40°C há um decréscimo acentuado na taxa de síntese proteica, com a quase totalidade da síntese proteica residual dedicada às hsp.

A temperatura ótima de síntese das hsp, i. é, a temperatura que corresponde a uma indução máxima da sua formação, varia muito com a espécie considerada, mas está normalmente correlacionada com a temperatura ambiental a que o organismo está naturalmente sujeito. Nos organismos que crescem normalmente expostos a uma gama ampla de temperaturas, a resposta máxima é obtida c. 10°C a 15°C acima da temperatura ótima de crescimento. Nos organismos que crescem sujeitos a uma gama mais estreita de temperaturas, a resposta máxima ocorre c. 5°C acima da temperatura ótima de crescimento.

A indução da síntese das hsp é um processo muito rápido. Assim, após uma subida brusca da temperatura, a síntese de hsp pode ser detectada ao fim de 20 minutos, podendo ser observado um aumento nos níveis de mRNA transcrito de genes hsp após 3 a 5 minutos. A síntese de hsp mantém-se o principal componente da síntese proteica durante 3 a 4 h, com as diferentes hsp a serem expressas diferencialmente ao longo deste período de tempo.

A indução da síntese das hsp é temporária, durando apenas algumas horas, mesmo na presença continuada de temperaturas elevadas. Contudo, quando as temperaturas são exageradamente elevadas, a síntese das hsp torna-se permanente, até as células começarem gradualmente a morrer. A repressão da síntese das hsp é também um processo muito rápido, quando as células são retornadas para condições de temperaturas normais. Contudo, as hsp são P. bastante estáveis, permanecendo nas células durante um período de tempo considerável após o fim do choque térmico.

A condição experimental ótima para a síntese das hsp em laboratório é um aumento brusco da temperatura. No entanto, a síntese de hsp é também induzida por um aumento gradual da temperatura, de modo semelhante ao que se passa nas condições naturais.

A função desempenhada pelas hsp, consideradas como um todo, está relacionada com a aquisição de termotolerância. A termotolerância pode ser definida como a capacidade que uma célula, tecido, órgão ou organismo tem de sobreviver a temperaturas normalmente letais, se for primeiramente submetido a uma temperatura subletal, suficientemente elevada para induzir a síntese de uma quantidade apropriada de hsp. A tem-

peratura e o tempo de exposição nas condições subletais têm de ser suficientemente elevados para permitir a acumulação de um nível adequado de hsp. P. ex., uma exposição de 2 h a 42°C (na presença de luz) ou a 43°C (na ausência de luz) é letal para plantas de lentilha-de-água menor (*Lemna minor*). Contudo, as plantas sobrevivem ao tratamento letal se forem previamente incubadas durante 4 h a 38°C.

Outros tratamentos ou stresses existem que permitem a aquisição de termotolerância, por conduzirem também à síntese de hsp. São os casos, p. ex., do tratamento com etanol, metais pesados ou anoxia. O inverso também é verdadeiro, i. é, o choque térmico induz tolerância ao etanol, anoxia, etc. Curiosamente, a administração de análogos estruturais de aminoácidos induz lentamente a síntese de hsp sem conduzir à aquisição de termotolerância — esta é uma excepção que confirma a regra, na medida em que estas células não adquirem termotolerância porque as hsp sintetizadas na presença de análogos de aminoácidos são não-funcionais.

Em geral, a identidade e a função desempenhada por cada uma das P. de choque térmico (consideradas individualmente) não são conhecidas. Como o calor desnatura as P., tem sido sugerido que muitas hsp estão envolvidas na protecção das estruturas celulares da desnaturação pelas temperaturas elevadas. Assim, as hsp podem evitar a desnaturação das P., ajudar na sua renaturação ou proceder à sua remoção após sofrerem desnaturação. A ubiquitina é uma P. de choque térmico. O seu papel como hsp deve estar relacionado com a via protolítica mediada pela ubiquitina, a qual poderá hidrolisar as P. desnaturadas pelo calor. Outras hsp funcionam como chaperones moleculares. Um chaperone importante, presente no lúmen do retículo endoplasmático, é a P. de ligação, um membro da família hsp70. As P. hsp70 apresentam actividade de ATPase e domínios de ligação a péptidos. Outros membros da família hsp70 incluem a Grp75 dos mitocôndrios e a Dnak do citoplasma bacteriano. A hsp70, p. ex., funciona nas células em condições normais como «desenrolase» — mantém as P. no estado desenrolado, à custa da energia libertada pela hidrólise do ATP, permitindo a sua translocação através de membranas.

A família das hsp de massa molecular baixa, particularmente abundante no caso das células vegetais, parece estar envolvida na formação de umas superestruturas, responsáveis pela sequestração de mRNA de controlo, denominadas grânulos de choque térmico (hsg, do inglês *heat shock granules*). Os hsg permitem uma pronta re-adaptação às condições pós-stresse, na medida em que libertam o mRNA de controlo após o retorno às temperaturas normais de crescimento, possibilitando uma síntese rápida das «house-keeping proteins».

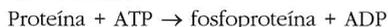
Outras P. que têm sido identificadas como hsp incluem a enrolase, a histona H2b em *Drosophila* e o γ -interferão em células de mamíferos.

IX PROTEÍNA CINASE

P. cinase é a designação atribuída às enzimas que catalisam a fosforilação de um ou mais grupos hidroxilo ou fenol presentes em P. Utilizam o ATP (ou outro nucleótido) como dador do gru-

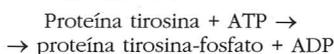
po fosforilo. São conhecidas mais de 110 P. que constituem a superfamília das P. cinase. Há dois grupos principais de P. cinase:

a) As enzimas que fosforilam grupos hidroxilo presentes em resíduos de serina ou de treonina, genericamente denominadas «proteínas cinases» (EC 2.7.1.37):



Estão incluídas neste grupo as cinases que regulam vias do metabolismo intermediário. São exemplos a glicogénio fosforilase cinase, a P. cinase A e a P. cinase C.

b) As P.-tirosina cinases, também referidas por P.-cinases (tirosina) (PTK; EC 2.7.1.112), enzimas que fosforilam grupos fenólicos presentes em resíduos de tirosina de P.:



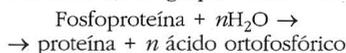
Esta actividade enzimática ocorre em alguns receptores de citocinas e em produtos de oncogenes; é, por isso, característica de certas P. membranares e de muitos oncogenes — c. um terço dos oncogenes conhecidos codificam PTKs. Exemplos de P.-substrato que são fosforiladas por estas enzimas são as enzimas glicolíticas enolase, fosfoglicerato mutase e lactato desidrogenase, três P. do citosqueleto (a vinculina, a p36 e a p81) e algumas glicoproteínas membranares. As PTKs ficam autofosforiladas ao servirem de substrato da sua própria actividade de PTK; em alguns casos, a autofosforilação é necessária para estender a actividade de PTK a outros substratos. No caso de alguns receptores da membrana, como acontece, p. ex., com o receptor da insulina, a ligação do ligando apropriado na superfície exterior da célula promove o aparecimento da actividade de PTK no domínio de estrutura virado para o citoplasma.

A P. cinase A, também denominada «proteína cinase» dependente do cAMP, é uma P. cinase que é regulada pelo AMP cíclico (cAMP). A forma inactiva da enzima é composta por duas cadeias polipeptídicas regulatórias e duas cadeias polipeptídicas catalíticas. A activação pelo cAMP origina dois monómeros cataliticamente activos e um dímero regulatório que liga quatro moléculas de cAMP. Há dois tipos de P. cinase A: a) No tipo I, a expressão das cadeias polipeptídicas regulatórias varia com o tecido, sendo constitutiva em alguns casos e indutível noutros. b) No tipo II, as cadeias regulatórias medeiam a associação a membranas por se ligarem a P. de ancoragem, nomeadamente à MAP-2 cinase e à AKAP.

P. cinase C (abreviatura: PKC) é qualquer membro de uma subfamília de P. cinase membranares, caracterizadas por necessitarem de fosfolípidos aniónicos para expressão da sua actividade catalítica, a qual é regulada por diacilglicerol e Ca^{2+} . Catalisam a fosforilação de grupos hidroxilo em resíduos de serina ou treonina de P. Foram já caracterizadas numerosas isoformas, as quais recebem as designações de α , β_1 , β_2 , γ , δ , ϵ , ξ , θ , η , τ , μ . Para concentrações fisiológicas de cálcio, a PKC é activada pelo diacilglicerol, o produto da acção da fosfolipase C sobre os fosfolípidos de inositol. Os inibidores da PKC incluem a bisindolilmaleimida, o 1-O-hexadecil-2-O-metil-

glicerol, a melitina, a floretina, a polimixina B e a estaurosporina. A P. cinase C α de *Bos taurus*, p. ex., é composta por 672 resíduos de aminoácidos (76,84 kDa).

P. fosfatase, também denominada fosfoproteína fosfatase (EC 3.1.3.16), é qualquer enzima que catalise a hidrólise de grupos fosfato em P.:



As P. fosfatases podem classificar-se em vários grupos:

a) As enzimas da classe I são específicas para grupos fosfato ligados a resíduos de serina ou de treonina. A fosfatase 1, p. ex., é dependente do ATP e do Mg^{2+} ; é composta por uma subunidade catalítica de 38 kDa e uma subunidade regulatória de 23 kDa, a qual pode ser fosforilada, activando a fosfatase.

b) As enzimas da classe II hidrolisam grupos fosfato ligados a resíduos de tirosina, sendo frequentemente designadas por fosfatases 3. São subdivididas em enzimas citoplasmáticas e em enzimas ligadas a membranas que podem exibir propriedades de receptor. A fosfatase 2A, p. ex., regula as actividades da fosforilase cinase b, da caseína cinase 2 e da MAP-2 cinase; é uma enzima citoplasmática que ocorre em várias formas oligoméricas, as quais contêm uma subunidade catalítica (c. 36 a 38 kDa), associada a uma ou duas subunidades regulatórias, a subunidade A (61 a 65 kDa) e a subunidade B (51 a 55 kDa).

As P. fosfatases, conjuntamente com as P. cinase, controlam o nível de fosforilação das P. celulares, constituindo um importante mecanismo de regulação do metabolismo.

X PROTEÍNA FOSFATASE

↗ Proteína cinase.

XI PROTEÍNAS G

É uma P. da parede celular de bactérias, presente em *Streptococcus* do grupo G. As suas propriedades e utilizações são semelhantes aos da ↗proteína A, mas não se liga a IgM, IgD ou IgA. Liga-se a todas as subclasses de IgG humanas, bem como a imunoglobulinas animais com as quais a P. A não reage bem.

XII PROTEÍNAS DAS LEGUMINOSAS

As sementes das plantas da família das Leguminosas têm, quando comparadas com as outras fontes de P. vegetal, um teor elevado em P., a qual constitui normalmente 20% a 40% da sua massa. A sua composição em aminoácidos aproxima-se do aminograma ideal para o homem e outros animais, excepto no que se refere aos aminoácidos sulfurados. Daqui resulta a observação, posta em prática por muitas pessoas com hábitos alimentares vegetarianos, de que as P. das leguminosas, de que é exemplo o feijão, complementam as P. dos cereais, de que é exemplo o arroz (↗Sementes dos cereais). As sementes das leguminosas são, pois, e de um modo geral, fortemente deficientes em metionina e cisteína. Além disso, pequenas deficiências em determinados aminoácidos são muitas vezes específicas. São os casos, p. ex., da fava, grão, ervilha e caju relativamente ao triptofano, do feijão para o triptofano e a valina, da soja para a valina, do feijão-frade para a isoleucina e do amendoim para a isoleucina e a treonina. Estas sementes contêm, pelo menos, duas a três vezes mais P.

do que as sementes dos cereais, e o teor em lisina é também duas a três vezes mais elevado do que o dos cereais, onde este composto é o mais limitante dos aminoácidos essenciais.

As sementes das leguminosas fornecem, por este motivo, uma fonte importante de P. na dieta alimentar do homem, em quase todos os países do mundo. Nos países mais pobres, a falta de P. de origem animal, ou seja, a escassez de P. com uma composição equilibrada em aminoácidos essenciais levou a atribuir às sementes de leguminosas a designação de «carne das pessoas pobres». Mesmo nos países mais ricos, que convertem ineficientemente quantidades tremendas de P. vegetal em P. animal, as dietas alimentares desequilibradas, muitas vezes com níveis exagerados de produtos de origem animal, estão a levar cada vez mais pessoas a adoptarem hábitos alimentares mais naturais, em que as sementes de leguminosas desempenham um papel importante em relação à P. fornecida. Nestes países, as sementes de leguminosas ocupam, pelos mesmos motivos, uma posição primordial a nível da alimentação animal.

Embora representadas normalmente por um número relativamente pequeno de P. diferentes, as P. de reserva das sementes de leguminosas são responsáveis por c. 70% do azoto total da semente. Em contraste, a pequena quantidade de outras P. que ocorrem na semente está presente numa enorme variedade, incluindo vários milhares de enzimas, P. regulatórias, de transporte, estruturais e de reconhecimento, inibidores de proteases e lectinas diferentes.

A tabela mostra os teores de P. mais frequentemente encontrados nas sementes das plantas leguminosas utilizadas na agricultura.

A primeira coluna da tabela indica o teor de P. das sementes das leguminosas mais comuns. Estas podem subdividir-se em três grupos, por ordem crescente do teor em P.:

- a) Grão de bico (*Cicer arietinum*), com c. 22%.
- b) Amendoim (*Arachis hypogaea*), ervilha (*Pisum sativum*), feijão-frade (*Vigna unguiculata*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), lentilha (*Lens culinaris*) e fava (*Vicia faba*), com teores de P. entre 25% e 30%.
- c) Feijão-de-asa (*Psophocarpus tetragonolobus*), soja (*Glycine max*) e tremoço branco (*Lupinus albus*), com concentrações de P. compreendidas entre 35% e 40%.

Os dois primeiros grupos, apesar de serem sementes com níveis elevados de P., são classificados como sementes ricas em hidratos de carbono, porque estes compostos são os maioritários em termos de composição global da semente. Contudo, a soja e o tremoço são mesmo consideradas sementes ricas em P.

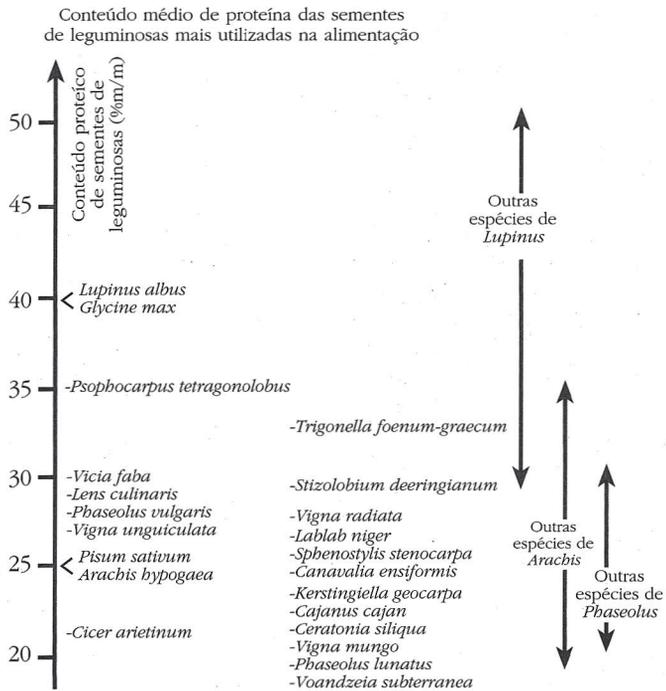
Na segunda coluna da tabela está apresentada a composição em P. de sementes de diversas espécies de leguminosas menos comuns, que varia de 18% (*Voandzeia subterranea*) a 33% (*Trigonella foenum-graecum*).

A terceira coluna da tabela mostra como varia o teor proteico em diferentes espécies pertencentes ao mesmo género; no género *Phaseolus* foram encontrados valores de 20% a 30%, no género *Arachis* de 19% a 35% e no género *Lupinus* valores de 27% a 50%. Deste modo, algumas espécies de *Lupinus* apresentam os conteúdos

proteicos mais altos de todas as leguminosas cultivadas. É importante notar que algumas destas sementes apresentam ainda teores elevados de lípidos. É o caso, p. ex., de *Arachis hypogaea*, com 45% de óleo, de *Glycine max*, com 20%, de *Psophocarpus tetragonolobus*, com 15%, e de espécies de *Lupinus*, com 5% a 15%.

As P. de reserva das sementes de leguminosas são tipicamente representadas por um número relativamente pequeno de espécies moleculares, as quais correspondem a c. 70% de azoto total da semente. Elas são globulinas e estão localizadas, na semente madura, em organitos especializados denominados corpos proteicos ou vacúolos de armazenamento de P. Apresentam algumas características particulares, como sejam a ocorrência de um grau elevado de polimorfismo, de um comportamento de associação/dissociação e da presença de estruturas de nível quaternário. Em 1898, T. Osborne e G. Campbell separaram, pela primeira vez, a fracção de globulinas da ervilha em dois componentes, a que atribuíram os nomes de vicilina e legumina. De então para cá têm sido detectados dois componentes nas P. de reserva da maioria das dicotiledóneas, com características semelhantes às da ervilha, e a que se atribuíram as designações genéricas, por analogia com a ervilha, de P. do tipo vicilina e do tipo legumina. Em algumas espécies, estas P. receberam denominações específicas. Assim, às P. do tipo vicilina foram atribuídos os nomes de vivilina na ervilha e na fava, α -conaraquina no amendoim, conglicinina na soja e β -conglutina no tremoço; as P. do tipo legumina foram chamadas de legumina na ervilha e na fava, α -araquina no amendoim, glicinina na soja e α -conglutina no tremoço.

As P. de reserva do amendoim começaram a ser estudadas há muitos anos, principalmente devido à grande importância destas sementes para



a extração de óleo. As duas globulinas principais foram isoladas pela primeira vez em 1880 e designadas por araquina e conaraquina. Subsequentemente, foram apelidadas de α -araquina e α -conaraquina para indicar que, embora predominantes, não constituem toda a fracção de globulinas da semente. A araquina é a P. dominante, constituindo c. três quartos da P. da semente. Foi fraccionada em dois componentes, A_I e A_{II}. A conaraquina é muito menos abundante; foi também fraccionada em dois componentes, I e II.

A soja é a espécie de leguminosa relativamente à qual as P. de reserva foram mais extensivamente estudadas. As quatro globulinas principais foram apelidadas de glicinina (a mais abundante) e α -, β - e γ -conglucinas.

As P. das sementes de tremçoço começaram a ser estudadas na década de 1950. As quatro globulinas principais receberam as designações de α -, β -, γ - e δ -conglutinas. A β -conglutina é a principal P. de reserva e as γ - e δ -conglutinas são constituintes menores.

As sementes do feijão são relativamente pobres em P. do tipo legumina, mas são ricas numa lectina, a fito-hemaglutinina, que pode representar c. 10% da P. da semente. A principal globulina de reserva é do tipo vicilina.

Por último, convém chamar a atenção que as sementes das leguminosas contêm normalmente factores de natureza antinutricional, de natureza proteica ou não, que lhe reduzem bastante o valor nutritivo das suas P. De entre os factores de natureza proteica são de destacar as ∇ lectinas, os inibidores de ∇ proteases e as ∇ proteínas tóxicas.

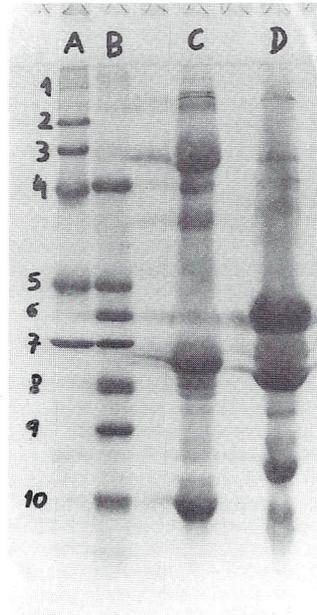
XIII PROTEÍNAS DO LEITE

Para os bebés, bem como para os restantes mamíferos recém-nascidos, o leite é o primeiro e, na maior parte dos casos, o único alimento ingerido durante um período de tempo considerável. Com a domesticação dos animais, tornou-se possível incluir o leite dos animais na dieta alimentar do homem. A concentração de P. no leite varia significativamente com a espécie animal. Assim, p. ex., aquele valor é de 3,6% na vaca, de 3,7% na cabra e de 6,3% na ovelha.

O leite da vaca doméstica, *Bos taurus*, é uma importante fonte de P. para o homem, e para as crianças em particular. A composição do leite reflecte o facto de ser a única fonte de alimento para os mamíferos muito jovens. O leite é uma solução aquosa de P., lactose, minerais e algumas vitaminas, e que inclui uma emulsão de glóbulos de gordura e de micelas coloidais dispersas de caseína que consistem de P., fosfato, citrato e cálcio. O leite de vaca apresenta a seguinte composição média: água, 86,6%; gordura, 4,1%; P., 3,6%; lactose, 5%; cinzas, 0,7%. Se a gordura for removida do leite, obtém-se o leite magro ou meio-gordo. Se a caseína é precipitada por redução do valor do pH para 4,6 (a 20°C), o resíduo recebe a designação de soro. O soro que se obtém durante o fabrico do queijo tem uma composição ligeiramente diferente, na medida em que alguma caseína é solubilizada e parte da lactose é convertida em ácido láctico por acção de bactérias. Após a formação da coalhada, no fabrico do queijo, a fervura subsequente do soro (com o auxílio, por vezes, de um pouco de sumo de

limão, para baixar o pH) permite coagular pelo calor a P. solúvel, a qual é utilizada no fabrico do requeijão.

O leite contém, tipicamente, 30 a 35 g de P. total por litro, com um valor nutritivo muito elevado. A P. do leite humano difere da do leite de vaca, particularmente no que se refere à composição em polipéptidos.



Padrão de polipéptidos do leite humano (coluna C; 10 μ l. de leite, 150 μ g de P.) e de vaca (coluna D; 4,4 μ l. de leite, 150 μ g de P.), obtido por electroforese desnaturante e redutora, em gel de poliacrilamida (R-SDS-PAGE). Colunas A e B: Marcadores de massa molecular: 1-205 kDa; 2-116 kDa; 3-97,4 kDa; 4-66 kDa; 5-45 kDa; 6-36 kDa; 7-29 kDa; 8-24 kDa; 9-20,1 kDa; 10-14,2 kDa

As P. do leite podem ser agrupadas em três classes principais: as caseínas, as P. do soro e as P. associadas com a fase lipídica.

Além dos produtos primários de genes, várias P. do leite resultam de proteólise pós-tradução, provavelmente devido à presença de pequenas quantidades de uma enzima do sangue, a plasmina. Assim, as γ -caseínas e a proteose-peptona derivam da β -caseína. O leite contém também pequenas quantidades de P. derivadas directamente do sangue, como sejam a albumina do soro e algumas das imunoglobulinas.

As caseínas formam uma família de fosfoproteínas relacionadas. Constituem 2,5% a 3,2% do leite e correspondem a c. 80% das P. do leite. Por este motivo, o coalho formado por aglomeração das micelas de caseína durante o fabrico do queijo retém a maior parte da P. do leite. Os quatro componentes principais (α _{S1}, α _{S2}, β - e κ -caseínas) e um componente menor (γ -caseína) representam c. 95% do total de caseínas. Os quatro componentes principais estão frequentemente na proporção de 3:0,8:3:1.

As letras gregas utilizadas para designar cada tipo de caseína foram originalmente definidas com base na sua mobilidade electroforética. O «s» da α _S-caseína refere-se à sua sensibilidade à pre-

Características das proteínas do leite

Componente	Concentração aproximada		Massa molecular (kDa)	pI	Grupos por molécula		
	em % da proteína do leite magro	g/l			Fósforo	Ligações de persulfureto	Sulfidrilo
Caseínas	78-85	27,2	—	4,6	—	—	—
α_s -caseína	45-55	—	—	—	—	—	—
α_{s1} -caseína ¹	—	13,6	23,5	5,1	8	0	0
α_{s2} -caseína	—	—	25	—	—	—	—
β -caseína	25-35	8,2	24	5,3	5	0	0
κ -caseína	8-15	4,1	19	3,7-4,2	1	0	0
γ -caseína	3-7	1,4	—	5,8	—	—	—
γ^1	—	—	20,5	—	1	0	0
γ^2	—	—	11,8	—	0	0	0
γ^3	—	—	11,5	—	0	0	0
Proteínas do soro	15-25	6,8	—	—	—	—	—
β -Lactoglobulina	7-12	3,6	18,3	5,3	0	2	1
α -Lactoglobulina	2-5	1,7	14,2	5,1	0	4	0
Imunoglobulinas	1,5-2,5	0,6	—	4,6-6,0	0	variável	variável
IgG1 ² , IgG2	—	—	160 (monómero)	—	—	—	—
IgM	—	—	900 (pentámero)	—	—	—	—
IgA	—	—	400 (dímero)	—	—	—	—
FSC ³	—	—	70	—	—	—	—
Albumina do soro	0,7-1,3	0,4	69	4,7	0	17	1
Proteose-peptona ⁴	2,0-4,0	0,7	4-40	3,7	0,5-2,0	0	0

¹ As α_{s0} , α_{s3} , α_{s4} , e α_{s5} são componente menores.

² Principal imunoglobulina do leite.

³ Do inglês *Free Secretory Component*.

⁴ Mistura heterogénea de glicoproteínas.

cipitação por iões de cálcio. As α_s -caseínas são sensíveis ao cálcio devido à presença de grupos fosfato, precipitando com o Ca^{2+} a pH 7,0. Embora os prefixos α_s , α , etc., definam espécies de caseínas, foi posteriormente reconhecido que há várias variantes de cada uma que diferem ligeiramente no que respeita às sequências de resíduos de aminoácidos. P. ex., a $\alpha_{s1}C$ -caseína difere da $\alpha_{s1}B$ -caseína por conter um resíduo de glicina em vez de um de ácido glutâmico na posição 192. Um exame detalhado das proporções destas variantes pode permitir identificar uma vaca a partir de uma amostra do seu leite.

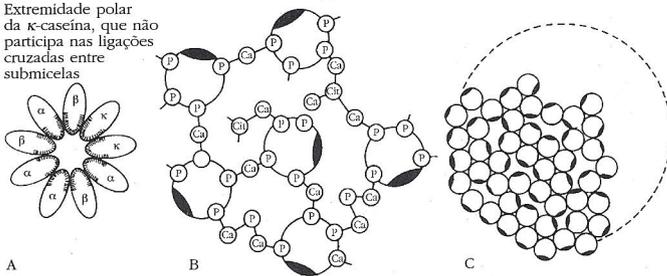
As caseínas são particularmente ricas em resíduos de fosfoserina, com um conteúdo relativamente elevado em resíduos de prolina e pobre em resíduos de cisteína. Aliás, a modificação pós-tradução de todas as caseínas, envolvendo a fosforilação dos grupos hidroxilo de resíduos de serina, é uma característica das caseínas. A α_{s1} -caseína possui oito a nove resíduos de ácido fosfórico por molécula. A α_{s2} -caseína é uma mistura de quatro P. contendo 10, 11, 12 ou 13 resíduos de fosfoserina por molécula.

As κ -caseínas são glicoproteínas contendo normalmente uma a três cadeias de tri- ou tetrassacáridos ligadas covalentemente aos grupos hidroxilo dos resíduos Thr-131, -133 e -135. Distinguem-se das outras caseínas pela presença destas cadeias e de apenas um resíduo de fosfoserina por molécula. A ligação peptídica susceptível à acção catalítica da quimosina localiza-se na superfície da sua molécula.

A caseína ocorre conjuntamente com o fosfato de cálcio, na forma de complexos esféricos fortemente hidratados denominados micelas. Estes com-

plexos apresentam um tamanho variável, com diâmetros a variarem entre 20 e 600 nm (diâmetro médio = 120 nm) e massas moleculares médias da ordem dos 100 MDa. O leite possui c. 10^{15} micelas por litro. Uma micela típica contém qualquer coisa como 2×10^4 moléculas de caseína. Foi feito um grande esforço, durante muitos anos, para tentar elucidar o arranjo estrutural das moléculas de caseína nas micelas. De acordo com o modelo proposto por Slattery e Evard, cada micela é um agregado de subunidades, cada uma das quais consiste de 25 a 30 moléculas de α -, β -, e κ -caseína em proporções semelhantes às que ocorrem no leite. A γ -caseína é um artefacto da metodologia utilizado para purificar as caseínas, na medida em que é um fragmento da β -caseína, que resulta de proteólise limitada por acção de proteases presentes no leite. A associação das moléculas de caseína para formar as subunidades depende das características específicas dos três tipos de caseínas, cada um dos quais apresenta uma forma alongada, do tipo de bola de *rugby*. Cada uma das suas moléculas possui uma extremidade com uma predominância de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e a outra extremidade com uma predominância de resíduos de aminoácidos polares. Assim sendo, as moléculas de caseína associam-se para formar as submicelas, do mesmo modo que as moléculas de um fosfolípido envolvem uma gota de óleo. As extremidades hidrófobas ficam viradas para o interior e as extremidades polares para o exterior (ver fig.). A extremidade polar da α -caseína possui oito resíduos de serina com grupos fosfato esterificados. A extremidade polar da β -caseína contém quatro destes resíduos de

fosfoserina. Finalmente, a extremidade polar da κ -caseína não apresenta resíduos fosfato, mas um ou mais dos seus resíduos de treonina contêm cadeias oligossacarídicas. Os grupos fosfato das caseínas α_s e β reagem com os iões de cálcio para ligar as submicelas entre si, quer directamente quer em cadeias que envolvem a participação de mais grupos fosfato ou de citrato. Nas zonas onde ocorre a κ -caseína não se observa ligação cruzada entre as submicelas, devido à incapacidade da extremidade polar desta P. em ligar o cálcio. Na formação das micelas, à medida que o número de submicelas que se associam vai aumentando, a tendência é para as zonas polares da κ -caseína, que não participam na associação das submicelas, dominarem a superfície exterior da micela, o que impede o seu crescimento indefinido.



Estrutura proposta para a micela de caseína. (A) Estrutura de uma submicela típica, ilustrando a associação entre os três tipos de moléculas de caseína envolvidas. As zonas predominantemente hidrofóbicas encontram-se sombreadas. (B) Estabelecimento de ligações cruzadas entre as submicelas de caseína. As regiões que não ligam cálcio, correspondentes às extremidades polares das moléculas de κ -caseína, estão representadas a negro: P - fosfato; Ca - cálcio; Cit - citrato. (C) Formação de uma micela. À medida que a curvatura da micela diminui, com o aumento do seu tamanho, menor oportunidade há para a ligação entre submicelas

As caseínas são definidas como sendo as P. que são precipitadas no leite a pH 4,6 e 20°C sob a forma de micelas associadas com cálcio. A caseína pode também ser convertida numa forma insolúvel por adição de renina ou de outras enzimas proteolíticas relacionadas. É o que acontece na formação da coalhada, um processo essencial no fabrico do queijo. No caso do iogurte, esta precipitação é causada pelo abaixamento do pH, provocada pela acumulação do ácido láctico formado por fermentação da lactose. Neste caso, não ocorre uma precipitação total da caseína. A associação entre as micelas de caseína origina uma textura do tipo gel que é característica do iogurte.

O fabrico do queijo envolve a adição de enzimas proteolíticas ao leite para formar a coalhada. A enzima tipicamente utilizada é a quimosina (EC 3.4.23.4), também denominada renina (*Renet* é a designação atribuída a uma preparação da enzima), obtida do quarto estômago dos ani-

mais ruminantes. Contudo, são hoje usadas outras proteases para o mesmo efeito, quer isoladamente quer em associação com a quimosina. São exemplos algumas proteases de fungos (especialmente de espécies de *Mucor*), a pepsina de porco e as cardosinas da flor do cardo.

A renina catalisa especificamente a hidrólise de uma única ligação peptídica na κ -caseína, a ligação que une os resíduos 105 e 106.

Esta reacção corta a κ -caseína em dois fragmentos polipeptídicos:

a) O segmento C-terminal da κ -caseína, que representa um terço da sua molécula, é denominado macropéptido da κ -caseína e fica no soro. É fortemente aniónico e contém as cadeias oligossacarídicas.

b) Os restantes dois terços da molécula, a *para- κ -caseína*, são fortemente hidrofóbicos e permanecem na constituição da submicela. A perda dos resíduos oligossacarídicos na κ -caseína significa que se podem agora estabelecer ligações cruzadas fortes entre as submicelas, com o consequente crescimento indefinido das micelas e a resultante formação rápida da coalhada. A coalhada deve ser mantida durante várias horas, durante as quais aumenta a acidificação produzida por microrganismos, o que confere uma firmeza apropriada à coalhada.

As P. do soro são normalmente obtidas do leite, depois da remoção da caseína, durante o fabrico do queijo. As duas principais P. do soro são a β -lactoglobulina e a α -lactalbumina. O soro contém c. 6,5% de matéria sólida, dos quais a lactose constitui quase 5%, a P. 1% e os sais minerais 0,5%. No seu total, as P. do soro correspondem a c. 20% da P. total do leite.

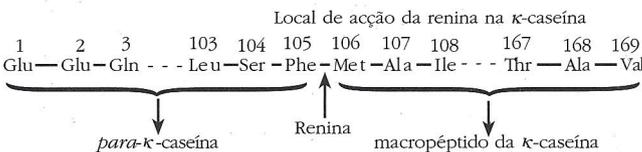
A β -lactoglobulina é a principal P. do soro. É um dímero (36,6 kDa) composto por duas subunidades (18,3 kDa), cada uma das quais contém um único grupo sulfidrílo (Cys 119) e dois resíduos de cistina.

A α -lactalbumina desempenha uma importante função biológica, estando presente em todos os leites que contêm lactose. A galactosil transferase, a enzima responsável pela síntese da lactose, só funciona quando a α -lactalbumina lhe está associada. É uma P. globular e contém quatro ligações de persulfureto.

As imunoglobulinas presentes no leite estão envolvidas na protecção dos recém-nascidos de muitas doenças perigosas. Sabe-se hoje que a exposição da mãe a muitas bactérias patogénicas comuns, e em especial às que provocam perturbações intestinais, como diarreia, as quais são extremamente perigosas para os recém-nascidos, leva ao aparecimento dos anticorpos respectivos no leite da mãe.

XIV PROTEÍNAS DO MÚSCULO

Carne é um termo genérico que se refere aos tecidos musculares edíveis do corpo de um animal. A musculatura dos animais pode considerar-se em três tipos principais de músculos: o músculo liso do tracto intestinal; o músculo cardíaco do coração; e o músculo esquelético, que contém a carne magra. O músculo é constituído por fibras, células com vários centímetros de comprimento e 0,01 a 0,1 mm de diâmetro. As fibras estão envolvidas por membranas (sarcolema) e estão dispostas em feixes que incluem gordura e tecido conjuntivo.



A carne fresca contém aproximadamente 75% de água. A P. constitui 50 a 95% do total de sólidos orgânicos da carne, dependendo do teor em lípidos. As P. do músculo podem subdividir-se em três classes principais, com base na sua solubilidade em solventes aquosos: as P. sarcoplásmicas, também genericamente denominadas de solúveis; as P. miofibrilares ou do sistemas contráctil; e as P. do estroma ou P. insolúveis.

a) As P. sarcoplásmicas, também designadas por P. do miogénio, são as mais solúveis. Podem ser extraídas do músculo e solubilizadas com água ou com soluções salinas diluídas, a pH neutro. Constituem 30% a 35% do total de P. do músculo esquelético ou um pouco mais no músculo cardíaco. Ocorrem no citoplasma das células dos músculos e contêm, pelo menos, 100 a 200 P. diferentes. A fracção solúvel é composta por enzimas, como, p. ex., as envolvidas na glicólise, e pelo pigmento do músculo, a mioglobina, responsável pelo armazenamento e transporte do oxigénio e pela cor vermelha da carne. A cor dos músculos depende do seu conteúdo em mioglobina, uma hemoproteína. No músculo do cavalo, p. ex., esta P. constitui c. 0,7% da sua massa, mas nas baleias e focas, em que há uma maior necessidade de armazenar oxigénio, pode atingir os 5,8%.

b) As P. miofibrilares ou P. do sistema contráctil são as P. componentes das miofibrilhas. Constituem 52% a 56% da P. total do músculo esquelético, mas apenas 45% a 50% do total de P. do músculo cardíaco. Contêm uma proporção elevada dos aminoácidos essenciais da carne. São solúveis em soluções salinas de força iónica elevada, mas não em água ou em soluções salinas diluídas. Embora sejam necessárias forças iónicas elevadas para «romper» as miofibrilhas, a maior parte destas P. é solúvel em água quando na forma livre. Formam a principal fracção proteica do tecido muscular e apresentam uma solubilidade intermédia relativamente à das outras duas classes de P. musculares.

Propriedades de algumas proteínas miofibrilares

Proteína	Concentração	
	[% (m/m) da miofibrilha]	Massa molecular (kDa)
Miosina	50-60	475
Actina	15-30	42
Tropomiosina	4-6	70
Troponina	4-6	72
C-proteína	2,5-3	140
α -Actinina	2-3	206
β -Actinina	< 1	70
M-proteína	3-5	160
Paramiosina ¹	2-30	220

¹ A paramiosina ocorre apenas nos músculos dos animais invertebrados.

As P. miofibrilares do músculo esquelético dos vertebrados são compostas por actina e miosina, as P. essenciais do processo da contração. Além destas, ocorrem seis P. com funções de regulação, a tropomiosina, a troponina, a α - e a β -actinina, o componente C e a M-P. Esta função de regulação envolve o controlo da interacção entre a actina e a miosina, bem como a regulação: da montagem das P. miofibrilares individuais em filamentos. São muitas as P. que constituem as miofibrilhas:

Proteínas das miofibrilhas	
Filamentos grossos	Miosina
	C-proteína
	I-proteína
	Creatina cinase
	Miomesina
Filamentos finos	Actina
	Tropomiosina
	Troponinas
	β -Actinina
	α -Actinina
Discos Z	α -Actinina
	Desmina
	Eu-actinina
	Filamina
	Proteína de 55 kDa
	Vimentina
Conectina	Sinemina

A miosina é uma molécula assimétrica, com uma massa molecular de 475 kDa, composta por duas cadeias polipeptídicas pesadas (200 kDa) e por dois pares de cadeias polipeptídicas leves (15 e 27 kDa). A miosina é única no sentido em que combina, numa só molécula, uma função estrutural e uma actividade enzimática. As duas cadeias pesadas encontram-se enroladas em torno uma da outra. Numa das extremidades, a molécula possui duas cabeças globulares, responsáveis pela sua actividade de ATPase e pela sua capacidade de interaccionar com a actina. Duas cadeias polipeptídicas leves estão associadas com cada cabeça globular. É a principal P. dos filamentos grossos e constitui 50% a 60% das P. miofibrilares contrácteis. Cada filamento grosso contém c. 400 moléculas de miosina. Esta P. é extraída do músculo com uma solução salina com uma força iónica de c. 0,6, a valores de pH ligeiramente alcalinos.

A actina é uma P. predominante dos filamentos finos. Constitui 15% a 30% da P. miofibrillar do músculo. A actina é normalmente extraída por exposição prolongada de um pó de músculo (obtido por extração com acetona) numa solução aquosa de ATP. A actina globular, denominada actina G, é uma forma monomérica da P., com uma massa molecular de c. 42 kDa. A actina G liga-se fortemente ao ATP e, na presença de magnésio, polimeriza-se espontaneamente, com a concomitante hidrólise do ATP a ADP + Pi, formando uma estrutura de hélice dupla designada por actina fibrosa ou actina F. A actina F interaccua com a miosina — cada subunidade de actina da hélice liga-se a uma cabeça globular da molécula da miosina. *In vitro*, a actina e a miosina formam um complexo denominado actomiosina.

A tropomiosina é uma P. composta por duas subunidades, com um enrolamento de duas cadeias em hélice α e com uma massa molecular de 70 kDa e um comprimento de c. 40 nm. As suas moléculas exibem grande tendência para formar agregados de moléculas individuais ligadas pelas extremidades.

A troponina consiste de três subunidades referidas por troponina C (17 a 18 kDa), troponina I (20 a 24 kDa) e toponina T (37 a 40 kDa). Cada subunidade manifesta uma função diferente. A troponina C é a subunidade responsável pela ligação ao cálcio, conferindo a sensibilidade ao cálcio do mecanismo de contração do músculo. A troponina I inibe fortemente a actividade de ATPase da actomiosina. A troponina T fornece o centro de ligação para a tropomiosina. O complexo tropomiosina-troponina é conhecido por factor de relaxação.

A C-P. forma c. 3% da massa dos filamentos grossos. É composta por uma única cadeia polipeptídica de 140 kDa. Parece desempenhar uma função de protecção dos filamentos de destruição por acção de forças ou de alterações na força iónica do meio.

A α -actinina está localizada nos discos Z. Tem uma massa molecular de 206 kDa e é composta por duas subunidades de tamanho idêntico. Forma um complexo estável com a actina F.

A β -actinina é uma P. dimérica, formada por dois polipeptídeos de 34 e 37 kDa. Liga-se à actina F e impede a recombinação da actina F fragmentada. Está localizada na extremidade livre dos filamentos finos e parece estar envolvida na regulação do comprimento destes filamentos.

A conectina é uma P. elástica que parece ser responsável pela elasticidade e continuidade mecânica das miofibrilhas do músculo estriado. É fortemente insolúvel.

A paramiosina ocorre nos músculos de moluscos e de outros animais invertebrados, podendo representar até 50% da sua P. estrutural total. Tem uma massa molecular de 220 kDa e apresenta um teor em hélice α de 100%. Forma o núcleo central dos filamentos grossos, contendo miosina nestes sistemas.

c) As P. do estroma são insolúveis em soluções aquosas neutras. A fracção insolúvel é a que fica após tratamento com soluções salinas de força iónica elevada. Constituem 10% a 15% da P. total do músculo esquelético e ligeiramente mais no caso do músculo cardíaco. Incluem lipoproteínas e mucoproteínas das membranas celulares, bem como as P. do tecido conjuntivo e algumas P. do sistema contráctil que não foram extraídas. As P. mais abundantes são o colagénio e a elastina, as quais compõem normalmente 40% a 60% e 10% a 20%, respectivamente, do total de P. do estroma. A presença das P. do estroma apresenta alguns inconvenientes para os animais que se

o comprimento das fibras de colagénio em c. um terço. Subindo a temperatura até aos 80°C, converte o colagénio dos mamíferos em gelatina. A elastina é uma P. estável que forma fibras com propriedades elásticas. Está presente, em quantidades elevadas, nos ligamentos e nas paredes dos vasos sanguíneos.

Os peixes e outros organismos marinhos constituem uma fonte importante de P. alimentar, na medida em que contêm tipicamente 15% a 20% de uma P. rica em aminoácidos essenciais. De entre as excepções é importante considerar o bacalhau seco, com um teor em P. de 81,8%, e as ostras, com 9,8% de P. A P. dos peixes e dos outros animais marinhos consiste de 20% a 30% de P. sarcoplásmicas, 70% a 80% de P. estruturais e apenas 2% a 3% de tecido conjuntivo. As estruturas miofibrilares são normalmente idênticas às dos mamíferos.

XV PROTEÍNAS DO OVO

Os ovos não fertilizados da galinha (*Gallus domesticus*) são utilizados quase exclusivamente para consumo humano. O peso médio de um ovo é de c. 58 g, dos quais a casca constitui 8% a 11%, a clara 56% a 61% e a gema 27% a 32%. A função biológica da gema e da clara é, obviamente, a de fornecer uma fonte de alimento e de protecção para o embrião em desenvolvimento. A estrutura organizada do ovo é importante não só em termos de reprodução das galinhas como no que se refere à alimentação humana. A posição central da gema, que constitui um bom meio de crescimento para os microrganismos, evita o seu contacto com as membranas internas da casca. A clara, por sua vez, em contacto com as membranas da casca, é um meio relativamente pobre para o crescimento de microrganismos, uma vez que várias das suas P. constituintes exibem actividade antimicrobiana, incluindo inibidores de enzimas, imunoglobulinas, P. de ligação a vitaminas, uma P. que liga ferro e a lisozima, uma enzima capaz de catalisar a hidrólise de peptidoglicanos, componentes da parede celular de muitos microrganismos.

A maioria das P. do ovo são glicoproteínas, em que os resíduos glicídicos se encontram unidos por uma ligação glicosídica a resíduos de serina ou treonina, ou por uma ligação do tipo amida a resíduos de asparagina. Algumas P. contêm fósforo ou enxofre ligados a resíduos de serina ou treonina. Também se encontram lípidos ligados a algumas das P. A casca, a clara e a gema contêm, respectivamente, 3,11% e 17,5% de P.

Composição do ovo de galinha, em percentagem do seu peso fresco

Componente	Matéria seca	Proteína	Lípidos	Hidratos de carbono	Cinzas
Clara	11,1	9,7-10,6	0,03	0,4-0,9	0,5-0,6
Gema	52,3-53,5	15,7-16,6	31,8-35,5	0,2-1,0	1,1
Ovo	25,0-26,5	12,8-13,4	10,5-11,8	0,3-1,0	0,8-1,0

alimentam de carne: tornam a carne mais rija, dependendo da quantidade e grau de ligações cruzadas entre as P. do tecido conjuntivo. Reduzem também o valor nutritivo da carne, devido ao seu baixo teor em aminoácidos essenciais. O colagénio, que constitui c. 20% a 25% da P. total do corpo dos mamíferos, apresenta uma estrutura em hélice tripla. O aquecimento em água do colagénio a temperaturas de 60-70°C reduz

A casca do ovo é composta por uma matriz de fibras de P. entrançadas e de cristais de carbonato de cálcio, numa proporção de 1:50. Além disso, a superfície da casca está coberta por uma cutícula, i. é, uma fina camada protectora de P. A casca possui numerosos poros (7000 a 17 000 por ovo), os quais estão preenchidos com fibras de P. que retardam a entrada de microrganismos no ovo. A cutícula proteica, insolúvel em água,

forma uma camada protectora, com c. 10 a 30 μm de espessura, sendo essencialmente composta por mucoproteínas e polissacáridos. Entre a face interior da casca e a clara localizam-se duas membranas, a exterior com uma espessura de 48 μm e a interior com uma espessura de 22 μm . Estas membranas são compostas por fibras de P.-polissacáridos.

O principal constituinte da clara de ovo é a água, que corresponde a c. 87% a 89%. A P. é o principal componente da matéria seca da clara. A tabela seguinte lista as principais P. que participam na composição da clara. A clara pode ser considerada um sistema proteico composto por fibras de ovomucina, numa solução aquosa de numerosas P. globulares.

Proteínas da clara do ovo

Proteína	% da matéria seca da clara	pI	Massa molecular (kDa)	Características
Ovalbumina	54	4,5	44,5	Fosfoglicoproteína
Ovotransferrina	12	6,1	76	Glicoproteína que liga iões metálicos (ferro)
Ovomucóide	11	4,1	28	Glicoproteína inibidora da tripsina
Ovomucina	3,5	4,5-5,0	5500-8300	Glicoproteína (sialoproteína), viscosa
Lisozima	3,4	10,7	14,3	Enzima que provoca a lise de algumas bactérias
Globulina G ₂	4,0	5,5	30-45	—
Globulina G ₃	4,0	4,8	—	—
Ovoinibidor	1,5	5,1	49	Glicoproteína, inibidor de proteases de serina
Inibidor da ficina	0,05	5,1	12,7	Inibidor das tioproteases
Ovoglicoproteína	1,0	3,9	24,4	Glicoproteína (sialoproteína)
Ovoflavoproteína	0,8	4,0	32	Liga riboflavina
Ovomacroglobulina	0,5	4,5	760-900	Glicoproteína, fortemente antigénica
Avidina	0,05	10	68,3	Glicoproteína, liga biotina

A ovalbumina é o principal componente proteico da clara, constituindo mais de 50% da sua P. É uma fosfoglicoproteína. Os seus três componentes, denominados A₁, A₂ e A₃, diferem no conteúdo em fósforo, contendo, respectivamente, dois, um e nenhum grupos fosfato e ocorrendo numa proporção de 85:12:3. A cadeia polipeptídica da ovalbumina é composta por 385 resíduos de aminoácidos, possui quatro grupos sulfidrílo, uma ligação de persulfureto e uma massa molecular de 44,5 kDa. A única cadeia glicídica, com uma massa molecular de 1560 a 1580 Da, está localizada na posição Asn-292 e os dois resíduos fosforilados de serina nas posições 68 e 344. Durante o armazenamento dos ovos, a ovalbumina é convertida em S-ovalbumina, uma P. mais resistente ao calor devido ao estabelecimento de ligações de persulfureto.

A ovotransferina, também denominada conalbumina, é uma glicoproteína que não contém fósforo nem grupos sulfidrílo. Contém uma só cadeia oligossacárida. Possui uma única cadeia polipeptídica e ocorre num equilíbrio de três formas com diferentes conteúdos em ferro: zero, um ou dois átomos de ferro (Fe³⁺) por molécula. Devido à sua capacidade de complexar iões metálicos, exhibe propriedades antimicrobianas. O ovo contém três P. inibidoras que variam em termos de composição, tamanho e acção inibitória; duas são inibidoras de proteases de serina (ovomucóide e ovoinibidor) e uma é inibidora das tioproteases (o inibidor da ficina). O ovomucóide é uma glicoproteína constituída por três domínios de estrutura separados, cada um dos

quais forma três ligações de persulfureto. O polipeptídeo é composto por 26% de hélices α , 46% de folhas pregueadas β , 10% de voltas β e 18% de estrutura aleatória. Contém c. 20% a 25% de hidratos de carbono, os quais estão presentes em três cadeias oligossacáridas ligadas à cadeia polipeptídica por resíduos asparaginilo.

A ovomucina é uma glicosulfoproteína grande, filamentosa e do tipo fibroso, que é responsável pela estrutura gelatinosa da clara. Está envolvida na deterioração da casca do ovo. É insolúvel em água e pode ser fraccionada em três componentes. Contém c. 30% de hidratos de carbono. Foram atribuídas designações de β -ovomucina e α -ovomucina, respectivamente, a fracções ricas (50%) e pobres (15%) em hidratos de carbono.

A lisozima é uma enzima capaz de provocar a lise de paredes celulares bacterianas. É composta por três componentes. É constituída por uma única cadeia polipeptídica, de 129 resíduos de aminoácidos, contendo quatro ligações de persulfureto e nenhum grupo sulfidrílo livre. O seu ponto isoeléctrico é o mais alto de todas as P. do ovo e a sua massa molecular uma das mais baixas.

A avidina é uma glicoproteína básica (pI = 10), composta por 128 resíduos de aminoácidos e capaz de ligar biotina. É um componente tóxico. O ovo inibidor é uma P. que inibe as actividades catalíticas da tripsina e da quimotripsina. A ovoflavoproteína é composta por uma apoproteína que liga fortemente a riboflavina. Parece funcionar como um sistema de armazenamento e de transporte da riboflavina para o embrião em desenvolvimento.

A ovomacroglobulina é uma glicoproteína grande, cujo papel biológico permanece desconhecido. Exhibe fortes propriedades antigénicas.

A gema do ovo contém c. 50% de água. As P. e os lípidos são os principais componentes da matéria seca. A gema pode ser considerada uma dispersão contendo uma grande diversidade de partículas uniformemente distribuídas numa solução proteica de livetina.

A lipovitelina compõe a fracção lipoproteica de densidade elevada (HDL). Pode ser separada em duas fracções, referidas por α - e β -lipovitelinas, com massas moleculares de c. 400 kDa. Contém c. 40% de lípidos neutros e 60% de fosfo-

Proteínas da gema do ovo

Proteína	% da matéria seca da gema	Características
Lipovitelina	17-18	Lipoproteína
Lipovitelena	12-13	Lipoproteína
Livetina	4-5	Globulina
γ -Vitelina	14-15	Fosfoproteína
β -Vitelina	14-15	Fosfoproteína
Vitelena	8-9	Fosfoproteína
Fosvitina	6	Fosfoproteína

lípidos, onde se incluem a fosfotidilcolina (75%), a fosfotidiletanolamina (18%) e a fosfatidilcolina (75%) e os lisofosfolípidos (7%).

A livetina pode ser fraccionada em três componentes ácidos, designados por α -, β - e γ -livetinas, com massas moleculares de 80, 45 e 150 kDa, respectivamente. Estas P. foram identificadas como albumina do soro (α -livetina), α_2 -glicoproteína (β -livetina) e γ -globulina (γ -livetina), sugerindo que derivam provavelmente do sangue da galinha.

A fosvitina é uma fosfoglicoproteína que contém c. 10% de fósforo, sob a forma de ácido ortofosfórico monoesterificado, representando aproximadamente 70% do fósforo total da gema. Foi fraccionada em dois componentes, com massas moleculares de 160 e 190 kDa, designados por α - e β -fosvitina, respectivamente. A β -fosvitina consiste de um único tipo de cadeia polipeptídica de 45 kDa, ao passo que a α -fosvitina é composta por três tipos de cadeias polipeptídicas de 37,5, 42,5 e 45 kDa. Contém quantidades excepcionalmente elevadas de serina (31% do total de resíduos de aminoácidos). A fosvitina é o transportador de ferro da gema, na medida em que os iões deste metal se ligam fortemente à P. para formar complexos solúveis. Na gema, ocorre também uma P. de ligação à riboflavina, semelhante à ovoflavoproteína da clara. É uma fosfoglicoproteína solúvel na água.

XVI PROTEÍNAS DO PÃO

De entre as várias espécies de cereais, apenas o trigo e o centeio produzem pão de boa qualidade. No caso particular do trigo, o endosperma constitui c. 80% da semente. A farinha branca, ao contrário da integral, deriva quase exclusivamente do endosperma. A P., que representa 7% a 15% da farinha de trigo, é de dois tipos diferentes: um tipo, que corresponde a c. 15% do total, consiste do que resta das P. típicas do citoplasma das células do endosperma, na sua maioria enzimas solúveis em água ou em soluções salinas diluídas. Os restantes 85% correspondem às P. de reserva da semente, as quais são tipicamente insolúveis em soluções aquosas, sendo responsáveis pela formação da massa do pão. Este último grupo de P. é conhecido, no seu conjunto, por γ glúten.

O conteúdo em P. da farinha varia com a variedade de trigo considerada. Em geral, as melhores farinhas para pão são as dos trigos de Primavera, que contêm teores elevados de P. (12% a 14%). São as chamadas farinhas fortes, assim denominadas porque originam massas de pão mais elásticas e mais resistentes à distensão que a massa das farinhas fracas. As farinhas fracas são apropriadas para o fabrico de biscoitos e para

pastelaria, sendo obtidas de trigos de Inverno e apresentando teores de P. normalmente inferiores a 10%.

As P. do glúten podem ser fraccionados em gliadinas e gluteninas, com base na sua solubilidade. As gliadinas são mais solúveis e podem ser extraídas em 70% (v/v) de etanol. Correspondem a c. um terço do glúten. As gluteninas, que comportam os restantes dois terços do glúten, são extremamente difíceis de dissolver completamente.

Uma só variedade de trigo pode conter mais de 40 gliadinas diferentes. Possuem, na sua maioria, massas moleculares entre 30 e 40 kDa e apresentam muitas características em comum, diferindo ligeiramente a nível da composição em aminoácidos. O seu conteúdo em resíduos de glutamina (36% a 45%) e de prolina (15% a 30%) é extraordinariamente elevado quando comparado com o de outras P. Isto é relevante do ponto de vista fisiológico, na medida em que estes aminoácidos são prontamente utilizados durante a germinação e têm uma boa proporção de azoto. Outros aminoácidos ricos em azoto, como a arginina, lisina e histidina, mas que são menos facilmente utilizados pelo metabolismo celular, ocorrem em muito pequena quantidade. Os níveis dos ácidos aspártico e glutâmico são também muito baixos, o que confere um carácter fracamente iónico às gliadinas e explica a sua falta de solubilidade.

As gluteninas têm sido muito difíceis de caracterizar. As suas massas moleculares variam de 40 kDa a 20 MDa, com um valor médio a rondar os 2 MDa. O tratamento das gluteninas com agentes fortemente redutores, capazes de romper ou quebrar as ligações de persulfureto (como, p. ex., o 2-mercaptoetanol), origina c. 15 subunidades proteicas diferentes, com massas moleculares compreendidas entre os 11 e os 133 kDa. São diferentes das gliadinas, embora apresentem uma composição em aminoácidos igualmente rica em glutamina e prolina.

Quando se adiciona água à farinha, forma-se o glúten à medida que as P. insolúveis da massa sofrem hidratação. O glúten forma assim a estrutura da massa da farinha de trigo, sendo responsável pela retenção de gás, o que torna possível a produção de produtos de panificação leves e levedados. As P. do endosperma do trigo possuem a capacidade única de formarem o glúten, e é esta capacidade que dá ao trigo o papel dominante que assume na dieta alimentar do homem. As propriedades viscoelásticas da massa dependem das gluteninas, as quais formam uma malha tridimensional distendida. Estabelecem-se ligações entre as cadeias polipeptídicas das moléculas das gluteninas, sendo as ligações de hidrogénio as mais importantes, mas desempenhando também as interacções electrostáticas e as interacções hidrofóbicas papéis de relevo. As gliadinas influenciam também as propriedades viscoelásticas da massa. Deste modo, sabe-se que a proporção gluteninas:gliadinas é um factor fundamental nas características da farinha para pão. Normalmente, uma proporção elevada de gluteninas origina massas mais fortes, que necessitam de ser mais amassadas e que produzem pães de maior volume.

XVII PROTEÍNA PATOGÊNESE

7 Proteínas PR.

XVIII PROTEÍNA PR

P. PR (de «Pathogenesis-Related») ou P. de patogênese são P. isoladas das plantas e que receberam essa designação por serem formadas *de novo* nos tecidos vegetais em consequência da sua infecção com um agente patogénico (fungo, bactéria, vírus, viróide). São P. solúveis, que se localizam nos vacúolos celulares ou nos espaços extracelulares (apoplasto das células), em geral de natureza monomérica e de baixa massa molecular (8-50 kDalton), que se mantêm solubilizadas a pH ácido (à volta de 3,0) e relativamente resistentes à acção de enzimas proteolíticas. As primeiras P. PR foram descritas em 1970 em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*; *Solanaceae*) que manifestam sintomas de hipersensibilidade em consequência da infecção com o vírus do mosaico do tabaco (TMV). Todavia, a designação de «proteínas PR», para este tipo de P., só viria a ser proposta em 1980 por Antoniwi e colaboradores. Estes investigadores propuseram também um sistema unificado de nomenclatura para as várias P. PR entretanto identificadas. De então para cá bastante se tem avançado nos conhecimentos sobre este tipo de P. Tornou-se assim evidente a sua presença numa grande diversidade de plantas, tanto dicotiledóneas (para além das iniciais tabaco e tomateiro) como monocotiledóneas.

Obtiveram-se informações sobre a sua acção biológica, constatando-se que muitas delas apresentam actividade enzimática do tipo hidrolítico, nomeadamente quitinase, β -glucanase, protease, peroxidase, ribonuclease. Também se adquiriram conhecimentos sobre as suas seqüências em aminoácidos, e os respectivos genes, o que veio facilitar o estabelecimento de relações de analogia molecular entre elas. Em consequência, surgiram propostas de agrupamento das P. PR em classes, inicialmente em número de 5, subsequentemente alargadas para 11 e actualmente já em número de 14 (ver tabela). São indicadas na tabela as P.-tipo consideradas como referência de cada classe, com a designação que receberam inicialmente e a planta de que foram isoladas.

Famílias de proteínas PR

Família	Membro-tipo (Planta)	Propriedades
PR-1	PR-1a (Tabaco)	Antifúngica
PR-2	PR-2 (Tabaco)	β -1,3-Glucanase
PR-3	P, Q (Tabaco)	Quitinases I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	•R• (Tabaco)	Quitinases I, II
PR-5	S (Tabaco)	Tipo taumatina
PR-6	Inibidor I (Tomate)	Inibidor de proteinase
PR-7	P ₆₉ (Tomate)	Endoproteinase
PR-8	Quitinase (Pepino)	Quitinase III
PR-9	Peroxidase da lenhina (Tabaco)	Peroxidase
PR-10	•PR1• (Salsa)	Tipo ribonuclease
PR-11	Quitinase classe V (Tabaco)	Quitinase I
PR-12	Rs-AFP3 (Rabanete)	Defensina
PR-13	THI2.1 (<i>Arabidopsis</i>)	Tionina
PR-14	LTP4 (Cevada)	Proteína de transferência de lípidos

Segundo a definição de P. PR, esta deverá ser sintetizada *de novo* na planta, em consequência do ataque do agente patogénico. Portanto, há

certos genes da planta que têm de ser especificamente activados por forma a conduzir a essa síntese. Ao analisar os mecanismos moleculares do processo constatou-se que estavam envolvidas substâncias designadas por eliciadores (7 Elicidiador), geralmente provenientes do próprio agente patogénico. Esses eliciadores, ao actuarem sobre a superfície das células da planta, vão originar um sinal que, ao ser transmitido ao núcleo, conduzem à desrepressão ou activação dos genes apropriados. É de notar que outras substâncias, como metais pesados, podem induzir idênticos efeitos na planta e, também, o ferimento ou a acção de agentes abióticos de stresse, como radiação ultravioleta UV, temperaturas elevadas, etc., podem desencadear a síntese de P. PR. É ainda de referir que P. idênticas a PRs são detectadas frequentemente nas plantas, constitutivamente, i. é, mesmo sem haver processo patogénico. Segundo a definição não deverão ser designadas por PRs. Como compromisso tem-se utilizado a designação de «P. do tipo PR» («PR-like proteins»). Subsiste, no entanto, a dúvida se se tratará de P. idênticas, ou das mesmas P. e se, portanto, a definição inicialmente proposta deveria ser modificada para as englobar. Do ponto de vista biológico verifica-se que as P. PR são importantes para a defesa das plantas, sendo um dos componentes dos mecanismos não específicos de que elas dispõem para esse fim.

XIX PROTEÍNAS DO QUEIJO

7 Proteínas do leite.

XX PROTEÍNA S

É uma glicoproteína, composta por uma única cadeia polipeptídica, que ocorre no sangue dos animais. Recebeu esta designação para denotar a cidade em que foi descoberta — Seattle. Apresenta uma massa molecular de 69 kDa e contém resíduos de γ -carboxiglutamilo. É uma P. sem função enzimática, dependente da vitamina K. Promove a ligação da 7P. C às plaquetas e funciona como cofactor da actividade anticoagulante da forma activada da P. C, i. é, da sua forma com actividade enzimática.

XXI PROTEÍNAS TÓXICAS

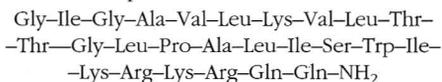
São maioritariamente P. de massa molecular baixa, compostas por uma única cadeia polipeptídica,

sem função enzimática, e produzidas por cobras e animais invertebrados, por plantas (fitotoxinas) e por linhas virulentas de bactérias.

Os venenos das cobras contêm uma mistura de polipéptidos e de P. muito tóxicas, destinadas a paralisarem e a matarem a presa, bem como enzimas que facilitam a difusão das toxinas e que iniciam a digestão da presa engolida. Estima-se que morram anualmente 30 000 a 40 000 pessoas devido a mordeduras de cobras. São exemplos destas toxinas as cobraminas A e B, a crotactina, a crotamina, a crotóxina e a taipoxina. Estas P. tóxicas são classificadas em função do seu modo de acção em três grupos principais: cardiotoxinas, neurotoxinas e inibidores de proteases. Apresentam massas moleculares próximas dos 7 a 8 kDa, sendo compostas por um número de resíduos de aminoácidos que varia normalmente entre 60 e 75. No entanto, algumas neurotoxinas podem ter massas moleculares maiores, da ordem dos 30 kDa, e apresentam mesmo estruturas de nível quaternário — é o caso, p. ex., da taipoxina, a toxina mais potente presente nos venenos das cobras, a qual é constituída por duas cadeias polipeptídicas diferentes. As neurotoxinas são muito estáveis, devido à presença na sua molécula de ligações de persulfureto.

Os princípios activos presentes no veneno do escorpião são as P. neurotóxicas denominadas escorpaminas. São semelhantes a algumas toxinas presentes no veneno das cobras, nomeadamente no que diz respeito à massa molecular (6,8 a 7,2 kDa), presença de quatro ligações de persulfureto, composição em aminoácidos e actividade biológica (atacam o sistema nervoso periférico e central).

A melitina é um polipéptido amidado, linear e tóxico (hemolítico), que é o principal componente do veneno da abelha, constituindo c. 50% da matéria seca do veneno. Provoca a destruição de membranas fosfolipídicas. É formada por 26 resíduos de aminoácidos, com a seguinte estrutura de nível primário:



É sintetizada sob a forma de um precursor, a prepromelitina (7Preproteína), um polipéptido composto por 70 resíduos de aminoácidos. A remoção proteolítica da sequência sinal de 21 resíduos de aminoácidos do seu terminal N conduz à formação da promelitina. A remoção da pró-sequência, com a consequente libertação da melitina, ocorre fora das células que sintetizam a toxina.

Exemplos de fitotoxinas são as viscotoxinas, um grupo de P. com um grau elevado de homologia e uma massa molecular de 4,84 kDa, presentes nas folhas e ramos do visco. Exibem actividade hipotensiva e provocam um abrandamento no bater do coração. As toxalbuminas ricina e abrina inibem a biossíntese de P. A abrina, a principal P. presente nas sementes da planta leguminosa *Abrus precatorius*, é extremamente tóxica para o homem, com uma dose letal a rondar os 0,5 mg. As sementes desta planta, vivamente coloridas de preto e vermelho, são utilizadas por nativos africanos na preparação de colares. Têm, por isso, ocorrido mortes, provocadas por envenenamento ocasional por acção da abrina. Sendo uma P., a abrina é desnaturada

pelo calor, desaparecendo o seu efeito tóxico quando a temperatura ultrapassa os 65°C. Outra P. tóxica, a ricina, está presente em *Ricinus communis*.

Muitas sementes de leguminosas contêm inibidores de 7proteases, os quais, não sendo toxinas por si, desempenham provavelmente um papel protector contra a predação, na medida em que reduzem o valor nutritivo das sementes em que ocorrem. Também algumas 7lectinas, presentes nas sementes de leguminosas e noutras famílias de plantas, podem ter uma acção na protecção das sementes do ataque de insectos.

De entre as P. tóxicas produzidas por bactérias, há a salientar as exotoxinas e as endotoxinas. As exotoxinas termolábeis das bactérias Gram positivas são excretadas para o meio de crescimento. São exemplos as cinco enterotoxinas excretadas por *Staphylococcus aureus* no tracto gastrointestinal e que provocam diarreia e vômitos. A enterotoxina B, p. ex., é composta por 293 resíduos de aminoácidos (28,37 kDa).

A toxina da difteria, produzida por *Corynebacterium diphtheriae*, é constituída por uma única cadeia polipeptídica ácida, com uma massa molecular de 62 kDa, altamente tóxica — é letal numa dose de 1 µg/kg de peso corporal. Inactiva a peptidil-transferase II das células eucariotas, ao promover a ligação da ADP-ribose à enzima.

A toxina do tétano, com uma massa molecular de 150 kDa, é produzida por *Clostridium tetani* em duas formas, uma composta por duas subunidades e outra apenas por uma. No rato, é letal numa dose de 0,01 ng/kg de peso corporal. Esta toxina liga-se às P. membranares associadas a vesículas (VAMP), provocando uma inibição gradual mas irreversível na libertação dos neurotransmissores.

As cinco toxinas *botulinum*, altamente tóxicas, produzidas por *Clostridium botulinum*, requerem a presença de grupos -SH livres para expressão da sua actividade neurotóxica. São resistentes à proteólise, mas são prontamente inactivadas pelo calor. No rato, são letais numa dose de 0,03 ng/kg de peso corporal. A botulina do tipo A, com uma massa molecular de 140 kDa, liga-se especificamente às membranas dos terminais nervosos periféricos, onde inibe irreversivelmente a libertação da acetilcolina.

As endotoxinas, relativamente resistentes às temperaturas elevadas, são libertadas por autólise das bactérias que as produzem. As toxinas da cólera, com massas moleculares compreendidas entre 84 e 102 kDa, são endotoxinas libertadas no intestino por *Vibrio cholerae* Gram-negativo. São compostas por dois tipos de subunidades com funções diferentes: a subunidade do tipo L exhibe uma afinidade elevada para os gangliósidos das membranas das células nervosas, de adipócitos, de eritrócitos, etc.; as subunidades do tipo H são responsáveis pela toxicidade. As colicinas, com uma massa molecular de 60 kDa, são endotoxinas produzidas por bactérias intestinais. A colicina E₂ inibe a divisão celular e a degradação do DNA e do RNA. A colicina E₃ inibe a biossíntese de P. por inactivar a subunidade ribossomal 30 S.

XXII PROTEÍNA DO VINHO

Os vinhos, tal como muitos outros produtos de origem natural, contêm quantidades variáveis de substâncias azotadas, as mais importantes das quais são as **7P**. Estes polímeros não contribuem, de modo significativo, para o valor nutritivo dos vinhos, uma vez que a sua concentração varia tipicamente entre 15 e 230 mg por litro. No entanto, as **P**. assumem uma importância tecnológica e económica muito considerável, na medida em que podem afectar muito a limpidez e a estabilidade dos vinhos. A limpidez é uma qualidade do vinho de grande importância, pois causa a primeira impressão no consumidor. É, por isso, necessário que os vinhos se mantenham estáveis e límpidos, independentemente das condições de armazenamento. A instabilidade das **P**. nos vinhos brancos é um dos defeitos de origem não-microbiana mais comuns nos vinhos comerciais. A insolubilização das **P**. nos vinhos brancos pode resultar de condições de armazenamento desfavoráveis, que conduzem à sua agregação. As **P**. desnaturadas podem subsequentemente precipitar, formando um sedimento ou depósito amorfo que origina uma turvação desagradável no vinho engarrafado que reduz o seu valor comercial e o torna inaceitável para venda.

Além do papel desempenhado pelas **P**. nos fenómenos de instabilidade dos vinhos, a contribuição destes polímeros para o aroma dos vinhos permanece desconhecida. A presença de **P**. em vinhos pode, no entanto, ser benéfica. Na realidade, foi encontrada uma correlação positiva entre a concentração proteica e a qualidade da espuma em vinhos espumantes. As **P**. parecem ser particularmente importantes na formação da espuma e na sua estabilidade em vinhos champagne.

As **P**. presentes nos vinhos têm origem na polpa das uvas utilizadas na sua preparação. Mais, estas **P**. foram recentemente identificadas como sendo **P**. relacionadas com a patogenicidade (**P**. **PR**, do inglês *Pathogenesis Related*), de que são exemplos as quitinasas, as **P**. do tipo tautomatina e os osmotina. Estas **P**. desempenham um papel biológico importante durante o desenvolvimento vegetativo da videira, e das uvas em particular, na medida em que protegem os tecidos onde ocorrem da acção de stresses bióticos e avióticos, especialmente do efeito dos numerosos fungos patogénicos que atacam a videira — como sejam, p. ex., os fungos responsáveis pelas doenças escoriose, podridão cinzenta, míldio e oídio. As **P**. **PR** caracterizam-se por serem muito resistentes à proteólise (i. é, à acção de proteases) e aos baixos valores de pH. Durante a maturação das uvas e fabrico do vinho, a grande maioria das **P**. da uva (bem como das leveduras autolisadas) são removidas ou degradadas por acção de proteases e do baixo valor de pH típico do sumo de uva e do vinho, excepto as **P**. **PR** que resistem bem a estas condições. A vinificação funciona, pois, como um processo de purificar as **P**. **PR**, que passam assim das uvas para os vinhos, onde causam os problemas de instabilidade. Estudos recentes mostraram também que as **P**. **PR** presentes num vinho exibem uma enorme diversidade de formas, mas que apresentam aspectos estruturais comuns. Estas **P**.

ocorrem em todos os vinhos, independentemente da casta utilizada, do ano e região em que as uvas foram produzidas e da tecnologia de fabrico empregue.

Tem sido desenvolvido trabalho de investigação no sentido de elucidar as causas que estão na origem da insolubilização das **P**. presentes nos vinhos. Estudos recentes demonstraram que, embora as **P**. tenham que estar presentes para precipitarem, o que as faz precipitar parecem ser factores de natureza não-proteica, como sejam o pH, a presença de polissacáridos e a presença de polifenóis. Não se observa, por isso, uma relação linear directa entre a tendência de um vinho para turvar e a sua concentração em **P**.

Não existe nenhum método conveniente para a remoção das **P**. do vinho. A técnica mais frequentemente utilizada pela indústria dos vinhos é a colagem com bentonite, um permutador de troca catiónica que, sendo possuidor de carga eléctrica negativa aos valores de pH do vinho, arrasta electrostáticamente as partículas no vinho que sejam portadoras de carga eléctrica positiva. Estão neste caso as **P**. **PR**, bem como outros compostos que contribuem para as propriedades organolépticas dos vinhos. Este último aspecto, conjuntamente com o volume do vinho que se perde sob a forma de borras no tratamento com a bentonite, tornam a aplicação deste método bastante desvantajosa. Infelizmente, parece não haver outro melhor. A utilização de anticorpos para as **P**. do vinho, imobilizados num suporte sólido inerte, está limitada pelo facto dos baixos valores de pH dos vinhos serem incompatíveis com a formação do complexo anticorpo-antígeno. A adição de proteases comerciais aos vinhos tem-se revelado ineficaz na medida em que as **P**. **PR** são extremamente resistentes à proteólise. A aplicação de técnicas mais recentes de biologia molecular na modificação genética das plantas de videira não parece também ser promissora. Na verdade, o «silenciamento» dos genes que expressam as **P**. **PR** na videira, com vista à futura redução da concentração destas **P**. nos vinhos, iria certamente agravar muito os problemas associados aos fungos patogénicos que atacam as videiras, na medida em que diminuiriam as defesas naturais da planta. Curiosamente, a tendência actual parece ir precisamente no sentido oposto, i. é, de sobre-expressar as **P**. **PR** nos tecidos da videira, com o objectivo de aumentar as suas defesas naturais contra o ataque dos fungos patogénicos — esta abordagem irá certamente agravar os problemas relacionados com a turvação dos vinhos.

XXIII PROTEÍNA Z

É uma das principais **P**. constituintes da fracção das albuminas do endosperma da cevada (*Hordeum vulgare*). Do ponto de vista estrutural, é semelhante à serpina, embora a sua função principal se relacione com o facto de ser uma **P**. de reserva. É particularmente rica em lisina. É composta por 399 resíduos de aminoácidos (22 dos quais são de lisina; 43,23 kDa).

R. BOAVIDA FERREIRA **I-XVII, XX-XXIII**C. PINTO RICARDO **XVIII**

BIBL.: De XVIII — L. C. Van Loon, W. S. Pierpoint, T. Booter e V. Conejero, «Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins», em *Plant Molecular Bio-*

logy Reporter, vol. XII, pp. 245-264, 1994; I. C. Van Loon e E. A. Van Strien, "The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins", em *Physiological and Molecular Plant Pathology*, vol. LV, pp. 85-97, 1999.

De XXII — R. B. Ferreira, M. A. Piçarra-Pereira, S. Monteiro, V. B. Loureiro e A. R. Teixeira, "The wine proteins", em *Trends in Food Science & Technology* 12, pp. 230-239, 2002.

proteínas (síntese de) — BIOQ. A síntese de polipéptidos pode ser conseguida por vários mecanismos: por via não-biológica, como no caso da síntese química, e por via biológica, como nos casos da síntese ribossomal e da síntese não-ribossomal.

1. A síntese química de polipéptidos a partir de aminoácidos, incluindo o caso de polipéptidos que não ocorrem naturalmente, encontra uma importante aplicação em diversas áreas, nomeadamente no estudo das propriedades dos polipéptidos, na formação de polipéptidos com características únicas ou na produção de polipéptidos farmacologicamente activos que se encontrem indisponíveis ou presentes em quantidades muito baixas na natureza. Uma das aplicações mais prometedoras da síntese química de polipéptidos é na preparação de vacinas sintéticas. Na verdade, muitas vacinas contra vírus têm sido obtidas por administração do vírus previamente inactivado, o que permite ao hospedeiro adquirir imunidade por sintetizar os anticorpos correspondentes. Contudo, os vírus inactivados presentes na vacina podem por vezes tornar-se activos e provocar doença em vez de conferirem imunidade. Por outro lado, é muitas vezes difícil produzir vírus em quantidade suficiente para a vacinação. Estes problemas são em alguns casos ultrapassados pela preparação de vacinas contendo polipéptidos sintéticos que possuam as sequências de resíduos de aminoácidos dos determinantes antigénicos virais, i. é, as sequências que estimulam o sistema imunológico a formar anticorpos contra o vírus.

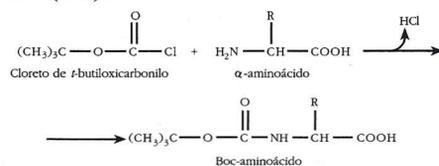
Os primeiros polipéptidos a ser sintetizados quimicamente foram os poliaminoácidos, facilmente formados com recurso às técnicas clássicas de química de polímeros. Estes homopolipéptidos permitiram um grande avanço nos estudos sobre as propriedades físico-químicas dos polipéptidos. Vincent du Vigneaud sintetizou pela primeira vez, em 1953, um oligopéptido biologicamente activo, o nonapéptido oxitocina. De então para cá, o desenvolvimento e aperfeiçoamento das metodologias utilizadas na síntese química de polipéptidos permitiram a síntese de numerosos polipéptidos e proteínas de importância biológica.

A síntese química de polipéptidos baseia-se essencialmente em dois tipos de estratégias:

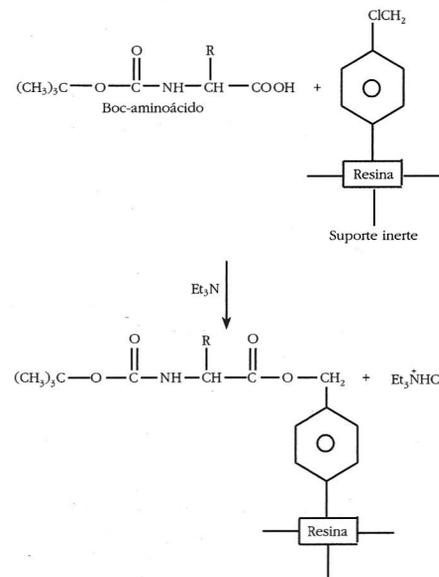
a) Ancoragem da cadeia polipeptídica nascente a um suporte sólido, a fim de eliminar as perdas enormes que ocorreriam no isolamento e purificação dos produtos de cada uma das muitas reacções se a síntese tivesse lugar em solução. Esta metodologia foi desenvolvida em 1962 por Bruce Merrifield, tendo ficado conhecida como síntese em fase sólida ou síntese de Merrifield.
b) Bloquear reversivelmente, em cada passo, todos os grupos reactivos do aminoácido que se procura ligar à cadeia polipeptídica crescente,

com excepção daquele que se pretende fazer reagir, a fim de impedir a sua reacção com outras moléculas indesejáveis (incluindo os do próprio aminoácido), ou seja, evitar a sua participação em reacções laterais. Deste modo, cada ciclo de adição de um resíduo de aminoácido à cadeia polipeptídica nascente terá que envolver um passo de ligação, com os grupos químicos reactivos e não-desejáveis do aminoácido bloqueados, e um passo de desbloqueamento. Do mesmo modo, as cadeias laterais reactivas do polipéptido em crescimento têm de ser mantidas bloqueadas durante o processo de síntese e posteriormente desbloqueadas no último passo da formação do polipéptido.

Nesta metodologia, os polipéptidos são sintetizados por adições sucessivas de aminoácidos ao terminal N do polipéptido em crescimento, i. é, são sintetizados da extremidade N para a C, por oposição à síntese biológica ribossomal (ver abaixo). Deste modo, o grupo α -amina de cada novo aminoácido que é adicionado tem de estar quimicamente protegido durante a reacção de ligação, o que é frequentemente conseguido pela adição do grupo *tert*-butiloxicarbonilo (Boc):



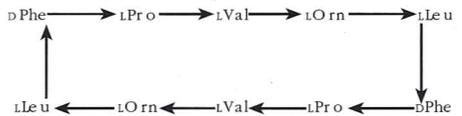
A síntese do polipéptido processa-se então de acordo com uma sequência cíclica de reacções:
a) **Ancoragem do aminoácido do terminal C a um suporte sólido** — O aminoácido do terminal C, com o seu grupo α -amina previamente bloqueado, é fixado a um suporte sólido, normalmente uma resina de poli-estireno entrecruzada, contendo grupos clorometilo.



A resina é subsequentemente filtrada e lavada e o grupo amina desbloqueado por tratamento

2. A síntese biológica, não-ribossomal de polipéptidos está envolvida na formação de muitos péptidos, os quais são sintetizados por enzimas solúveis e não pelos ribossomas usando moléculas de mRNA como moldes. A sua síntese não é, por isso, afectada pelos inibidores clássicos da síntese proteica, de que é exemplo o cloranfenicol. A γ glutamina constitui um bom exemplo de um péptido que é sintetizado por acção de enzimas solúveis em dois passos. Muitos antibióticos de natureza peptídica, como, p. ex., a gramicidina S, as tirocicinas e as polimixinas são também sintetizados por enzimas solúveis. Os sistemas responsáveis pela sua síntese consistem de multienzimas, em que os grupos aminoácido activados são transferidos para grupos tiol com formação de intermediários tioéster. Estas multienzimas são normalmente de grandes dimensões, com massas moleculares a variarem entre 120 kDa e 1,7 MDa. Os genes respectivos consistem de módulos repetidos, cada um especificando a incorporação de um resíduo do aminoácido. Os genes estão agrupados em conjuntos, associados a genes que codificam proteínas auxiliares para a síntese de precursores, enzimas de modificação, sistemas de regulação, etc.

Considere-se o caso, p. ex., da gramicidina S, um decapeptido cíclico produzido por *Bacillus brevis*, composto por dois pentapéptidos idênticos unidos «cabeça-com-pés» e cuja síntese foi elucidada por Fritz Lipmann:

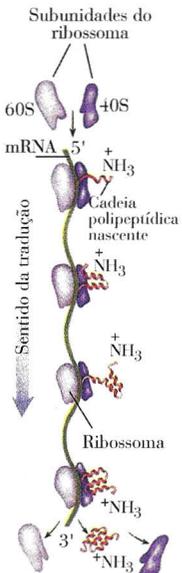


Duas enzimas estão envolvidas na síntese da gramicidina S: E_I (280 kDa) e E_{II} (100 kDa). E_I contém como cofactor uma molécula de fosfopanteteína ligada a um resíduo de serina. Os aminoácidos Pro, Val, Orn e Leu são activados pela formação (dependente da hidrólise do ATP) de uma ligação tioéster entre o aminoácido e resíduos de cisteína de E_I , com um processo idêntico a ocorrer entre a D Phe e E_{II} . O processo de polimerização é iniciado pela transferência do resíduo de D Phe de E_{II} para o resíduo de Pro ligado a E_I , com formação de um dipéptido. O oligopéptido em crescimento é então sequencialmente transferido para os restantes aminoácidos do pentapéptido, num mecanismo que, à semelhança do que acontece com a síntese ribossomal, vai do terminal N para o terminal C. É o resíduo de fosfopanteteína de 2 nm de comprimento que recolhe sequencialmente os resíduos de aminoácidos ligados a E_I e sintetiza o pentapéptido através de reacções alternadas de transeptidação e transtilação. O passo final consiste na reacção, «cabeça-com-pés», do pentapéptido ligado a E_I com um segundo conjunto idêntico para formar o decapeptido cíclico.

3. A síntese biológica, ribossomal de polipéptidos. É assim denominada a síntese bioquímica de proteínas, que consiste num processo cíclico, consumidor de energia, com passos múltiplos, em que os aminoácidos livres são polimerizados numa sequência determinada geneticamente para formar polipéptidos. O processo global de sín-

tese proteica mediada pelo mRNA é frequentemente referido apenas por γ tradução, significando a tradução da informação genética, i. é., a tradução da sequência de nucleótidos presente num mRNA na sequência de resíduos de aminoácidos de um polipéptido. Requer a presença de RNA mensageiro (mRNA), ribossomas, tRNA, aminoácidos, várias enzimas e factores de natureza proteica (alguns dos quais são parte integrante do ribossoma), certos cationes e ATP e GTP como fontes de energia. Nas células eucariotas, p. ex., a S. P. envolve a cooperação de c. 300 macromoléculas para sintetizar polipéptidos: mais de 70 proteínas ribossomais, mais de 20 enzimas para activação dos aminoácidos precursores, 12 ou mais enzimas auxiliares, factores específicos para as fases de iniciação, alongamento e terminação dos polipéptidos, c. 100 enzimas adicionais para o processamento final e mais de 40 tipos de RNAs de transferência (tRNA) e ribossomais (rRNA). As células contêm, tipicamente, milhares de cópias de cada proteína e de cada tipo de RNA. Deste modo, os c. 20 000 ribossomas, 100 000 enzimas e factores proteicos e 200 000 tRNAs envolvidos, presentes numa célula bacteriana típica (com um volume aproximado de 100 nm^3) podem corresponder a mais de 35% do seu peso seco. A S. P. processa-se a uma taxa muito elevada. P. ex., uma célula de *Escherichia coli* a 37°C leva c. 5 s a sintetizar um polipéptido com 100 resíduos de aminoácidos. As células sintetizam milhares de proteínas diferentes, a taxas que se encontram finamente reguladas, de modo a sintetizarem apenas o número de cópias necessário de cada uma, sob um dado conjunto de condições metabólicas. A síntese da maioria dos péptidos presentes nas células envolve a participação de ribossomas. Estão incluídas algumas pequenas hormonas, como a oxitocina e a vasopressina, que são sintetizadas sob a forma de γ poliproteínas.

A S. P. é o mais complexo dos mecanismos biosintéticos e a sua elucidação constituiu um dos maiores desafios da história da Bioquímica. Foi em meados do séc. xx que a atenção dos bioquímicos se dirigiu para a compreensão do mecanismo responsável pela síntese proteica. Admitiu-se inicialmente que a via responsável pela S. P. envolveria a utilização de enzimas para sintetizar péptidos intermediários, que seriam posteriormente unidos uns aos outros. Não só o número de enzimas envolvidas teria de ser muito grande, como nunca se detectou a formação dos referidos péptidos intermediários. Do ponto de vista teórico surgiu o conceito de que os aminoácidos seriam primeiramente alinhados ao longo de um molde e, subsequentemente, unidos uns aos outros por ligações peptídicas. Depois da elucidação da primeira estrutura do DNA, em 1953, tornou-se claro que o molde seria um ácido nucleico. Pouco depois, em 1955, Paul C. Zamecnik e colaboradores demonstraram, em Boston, a síntese de um polipéptido por uma fracção microsomal isolada de fígado de rato, a qual continha a presença de partículas (os ribossomas), um extracto celular solúvel, ATP e GTP. O primeiro passo na S. P. consiste na activação dos aminoácidos para formar complexos do tipo aminoácido-adenilato. Os aminoácidos são seguidamente transferidos para molé-



Esquema ilustrando a tradução simultânea realizada por quatro ribossomas eucariotas de uma molécula de mRNA, deslocando-se da extremidade 5' para a extremidade 3'

culas de tRNA (inicialmente designado por RNA solúvel), aos quais são unidos por ligações éster. O molde é composto por mRNA, o qual se associa aos ribossomas.

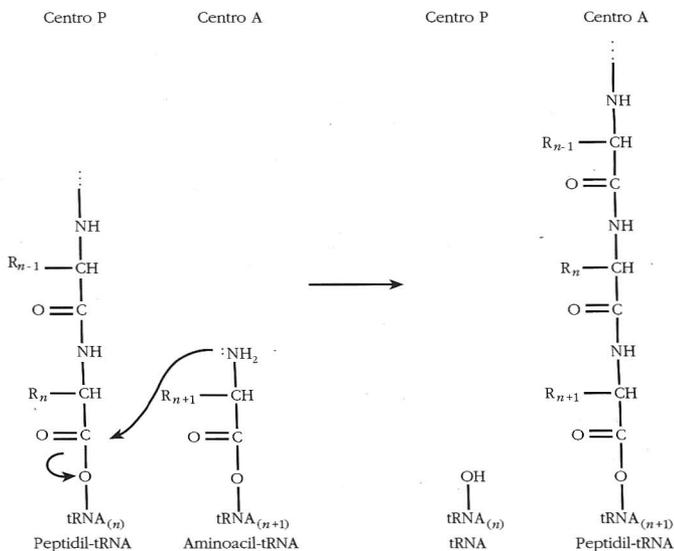
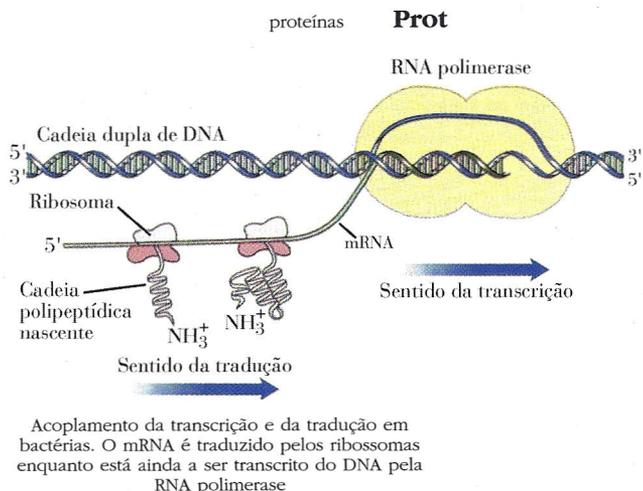
Howard Dintzis mostrou, em 1961, que a síntese dos polipéptidos se processa por adições sucessivas de aminoácidos a uma cadeia polipeptídica crescente, do seu terminal N para o terminal C. Por outro lado, os ribossomas «lêem» o mRNA na direcção 5' → 3'. A observação de que o mRNA é também sintetizado na direcção 5' → 3' (Transcrição) explica que, no caso dos procariontes, os ribossomas iniciem a tradução em mRNAs nascentes.

Os ribossomas envolvidos na biossíntese de proteínas estão dispostos sequencialmente ao longo da molécula do mRNA como contas ao longo de um colar, formando superestruturas denominadas polirribossomas ou, simplesmente, polisomas. Os ribossomas individuais encontram-se separados por espaços de 5 a 15 nm, de modo que cada mRNA contém aproximadamente um ribossoma por cada 80 nucleótidos. Os polisomas formam-se porque após um ribossoma activo ter deixado o centro de iniciação, um segundo ribossoma pode iniciar a síntese no mesmo centro. Em cada momento, vários ribossomas (entre 10 e 100) estão posicionados ao longo da molécula de mRNA; os ribossomas localizados mais próximo da extremidade 3' do mRNA possuem as mais longas cadeias polipeptídicas nascentes, ao passo que os mais próximo da extremidade 5' traduziram menos codões, contendo, por isso, péptidos mais curtos. Deste modo, os polisomas, permitindo a tradução simultânea de cada molécula de mRNA por muitos ribossomas, tornam muito eficiente a utilização do mRNA. Esta eficiência é levada ao extremo no caso das bactérias, em que, como vimos atrás, ocorre uma estreita ligação entre a transcrição e a tradução. Na verdade, os mRNAs são sintetizados e traduzidos na direcção 5' → 3', o que possibilita aos ribossomas começarem a traduzir a extremidade 5' de um mRNA antes da transcrição se encontrar completa.

A situação é diferente nos eucariotas, em que as moléculas de mRNA recentemente transcritas no núcleo têm de ser transferidas para o citoplasma para serem traduzidas.

Durante a síntese de polipéptidos, os resíduos de aminoácidos são sequencialmente adicionados ao terminal C da cadeia polipeptídica nascente ligada ao ribossoma. O crescimento do polipéptido nascente ocorre pela transferência do peptidil-tRNA para um novo aminoacil-tRNA, para formar um peptidil-tRNA um resíduo de aminoácido mais longo. Cada ribossoma possui, por isso, três centros de ligação ao tRNA: um centro P (de Peptidilo), que liga o complexo Met-tRNA ou o peptidil-tRNA, um centro A (de Aminoacilo), que liga o novo aminoacil-tRNA, e um centro E (do inglês *Exit* = saída) ou centro de saída, que liga temporariamente a molécula de tRNA libertada. Deste modo, a formação de cada ligação peptídica, catalisada pela actividade de peptidil-transferase do ribossoma, ocorre de acordo com a fig. da coluna 206.

O peptidil-tRNA ligado ao centro P do ribossoma é transferido para o aminoacil-tRNA do centro A, com formação de uma nova ligação peptídica.



Reacção de formação de uma ligação peptídica, catalisada pela actividade de peptidil-transferase do ribossoma.

O grupo amina do aminoacil-tRNA no centro A desloca nucleofilicamente o tRNA do peptidil-tRNA do centro P, de que resulta a transferência do polipéptido nascente para o tRNA do centro A

ca. Subsequentemente, o tRNA desilado presente no centro P é substituído pelo novo peptidil-tRNA (que vem do centro A) e transferido para o centro E.

Há cinco fases principais na síntese biológica ribossomal de proteínas, as quais envolvem a participação de muitos factores proteicos e de várias moléculas de ATP e de GTP, as quais funcionam sequencialmente e de modo cíclico:

- activação dos aminoácidos;
- iniciação;
- alongamento;
- terminação e libertação;
- enrolamento e processamento da cadeia peptídica.

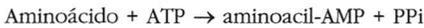
Estas fases funcionam sequencialmente e de modo cíclico. Os ribossomas participam, por isso, num ciclo, durante o qual se dissociam nas suas duas subunidades e se voltam a montar. Como o sistema funcional na biossíntese de pro-

teínas é o polissoma, a iniciação, alongamento e terminação decorrem simultaneamente ao longo da mesma molécula de mRNA.

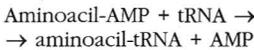
O mecanismo de síntese proteica é muito semelhante em todos os tipos de células, com algumas pequenas diferenças entre células procariotas e eucariotas, as quais explicam a acção diferencial exibida por alguns antibióticos como o cloranfenicol e a ciclo-heximida. Além das diferenças no número e nas propriedades dos factores solúveis, a principal distinção reside na iniciação da cadeia polipeptídica: o resíduo inicial é a formilmetionina nos procariotas, ao passo que nos eucariotas, com a excepção dos mitocôndrios e cloroplastos, é a metionina.

A) *Activação dos aminoácidos* — Cada aminoácido é activado e ligado covalentemente a um tRNA específico, em reacções de esterificação, à custa da energia de hidrólise do ATP, catalisadas pelas aminoacil-tRNA sintetases, num processo que não requer a presença de polissomas. As aminoacil-tRNA sintetases formam um grupo de enzimas de activação, dependentes da presença de Mg^{2+} , cada uma das quais é específica para um dado aminoácido e para um ou mais tRNAs correspondentes. Na realidade, as proteínas são basicamente construídas a partir dos 20 aminoácidos proteicos, os quais são inicialmente activados numa reacção com o ATP (reacção 1) catalisada pelas aminoacil-tRNA sintetases. Cada uma destas enzimas é específica para um único aminoácido proteico:

Reacção de activação (1):



Reacção de transferência para o tRNA (2):



Os resíduos de aminoacilo são reguladamente transferidos dos complexos activados na reacção 1 para moléculas específicas de tRNA (reacção 2). É nestes dois passos, catalisados pelo mesmo centro activo da mesma enzima, que ocorre a fase crítica de selecção dos aminoácidos, pois, aparentemente, pouca discriminação tem lugar nos passos posteriores associados à incorporação dos resíduos de aminoácidos nos polipéptidos em alongamento. A grande especificidade das aminoacil-tRNA sintetases assegura uma selecção quase perfeita dos substratos dentro do grupo dos 20 aminoácidos proteicos. Contudo, certos aminoácidos não-proteicos (p. ex.: o ácido azetidina-2-carboxílico relativamente à prolina), podem actuar como substratos alternativos com certas enzimas, podendo ser anormalmente introduzidos nas moléculas de proteína. É importante referir que as aminoacil-tRNA sintetases são específicas não só para cada aminoácido mas também para os tRNAs. A capacidade de discriminação relativamente a várias dúzias de tRNAs é tão importante para o rigor da síntese proteica como a selecção dos aminoácidos. De facto, a interacção entre as aminoacil-tRNA sintetases e os tRNAs tem sido descrita como o segundo cód. genético, cujas regras são aparentemente mais complexas do que as do primeiro 7cód. genético. A ligação éster estabelecida entre o aminoácido e o tRNA possui um valor elevado de energia livre de hidrólise ($\Delta G^\circ = -29 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$). O ácido

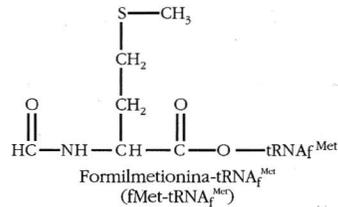
pirofosfórico formado na reacção de activação sofre hidrólise a duas moléculas de ácido ortofosfórico, numa reacção catalisada pela pirofosfatase. Deste modo, são gastas duas ligações fosfato ricas em energia por cada molécula de aminoácido que é activada, o que torna a reacção global de activação do aminoácido essencialmente irreversível. Assim sendo, a aminoacilação do tRNA desempenha dois papéis fundamentais:

- a) a activação do aminoácido para formação da ligação peptídica;
- b) a selecção correcta do aminoácido para subsequente incorporação na cadeia peptídica, já que a identidade do aminoácido ligado a cada tRNA não é verificada no ribossoma.

As fases seguintes da biossíntese de proteínas ocorrem sequencialmente e de modo cíclico em cada ribossoma do polissoma.

B) *Iniciação da cadeia polipeptídica* — Nesta fase, o mRNA que codifica o polipéptido a ser sintetizado liga-se à subunidade mais pequena do ribossoma, ao que se segue a ligação do aminoacil-tRNA iniciador e a subunidade maior do ribossoma para formar o complexo de iniciação. O anticodão do aminoacil-tRNA iniciador emparelha com o codão correspondente do mRNA (o codão AUG), o qual sinaliza o início da cadeia polipeptídica. Este processo requer o consumo de GTP.

Nos procariotas, o início da tradução requer um codão especial: o codão para a metionina, AUG (no caso dos procariotas, também, ocasionalmente, o codão para a valina, GUG). Este codão especifica uma forma particular do $\text{Met-tRNA}^{\text{Met}}$, em que o resíduo de metionina vem *N*-formilado. Deste modo, a *N*-formilmetionina (fMet) é o resíduo *N*-terminal dos polipéptidos dos procariotas.



O tRNA que reconhece o codão de iniciação, i. é., o $\text{tRNA}_f^{\text{Met}}$, difere do tRNA que especifica resíduos internos de metionina, o $\text{tRNA}_m^{\text{Met}}$, embora reconheçam o mesmo codão. O $\text{tRNA}_f^{\text{Met}}$ desacilado é aminoacilado com metionina pela mesma aminoacil-tRNA sintetase que aminoacila o $\text{tRNA}_m^{\text{Met}}$. Contudo, o $\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$ resultante é especificamente *N*-formilado a $\text{fMet-tRNA}_f^{\text{Met}}$ numa reacção enzimática que utiliza o ácido *N*¹⁰-formiltetra-hidrofólico como dador do grupo formilo. A enzima de formilação não reconhece o $\text{Met-tRNA}_m^{\text{Met}}$. Os polipéptidos nascentes dos procariotas sofrem desformilação do seu resíduo de fMet num mecanismo de pós-tradução, a qual é seguida, no caso de muitas proteínas, por remoção do resultante resíduo *N*-terminal de metionina.

O codão AUG especifica não só o resíduo inicial de Met de um polipéptido como também codifica os resíduos internos de Met. Além disso, as moléculas de mRNA contêm muitos codões AUG (bem como GUG) em diferentes sequên-

cias nucleotídicas. É, por isso, de admitir que um centro de iniciação da tradução seja especificado por mais do que um simples codão de iniciação. Em *Escherichia coli*, o rRNA 16S contém uma sequência rica em pirimidinas na sua extremidade 3'. John Shine e Lynn Dalgarno demonstraram, em 1974, que esta sequência é complementar de um tracto de 3 a 10 nucleótidos, rico em purinas (a sequência de Shine-Dalgarno), o qual se localiza c. 10 nucleótidos a montante do codão de iniciação de praticamente todos os mRNAs dos procariontes. O emparelhamento de bases entre a sequência Shine-Dalgarno do mRNA e o rRNA 16S permite ao ribossoma seleccionar o codão de iniciação apropriado.

O início da síntese de um polipéptido é um processo que decorre em três passos e que requer a participação de factores de iniciação solúveis e de natureza proteica. Na realidade, os ribossomas intactos não se ligam directamente ao mRNA para iniciar a síntese proteica. O início da síntese é um processo complicado, em que as duas subunidades ribossomais e o fMet-tRNA^{Met} são montados numa molécula de mRNA correctamente alinhada de modo a formar um complexo competente para iniciar a síntese. Esta montagem exige a participação de factores de iniciação de natureza proteica, os quais não se encontram permanentemente associados aos ribossomas. No caso de *E. coli*, a iniciação envolve três factores de iniciação denominados IF-1, IF-2 e IF-3 (IF do inglês *Initiation Factor* = factor de iniciação).

Lista dos factores proteicos solúveis que participam na síntese de polipéptidos em *Escherichia coli*

Factor	Massa molecular (kDa)	Função
Factores de iniciação		
IF-1	9	Participa na ligação do IF-3
IF-2	97	Liga o tRNA iniciador e o GTP
IF-3	22	Liberta a subunidade 30S do ribossoma inactivo e ajuda na ligação ao mRNA
Factores de alongamento		
EF-Tu	43	Liga o aminoacil-tRNA e o GTP
EF-Ts	74	Remove o GDP do EF-Tu
EF-G	77	Promove a translocação ao ligar GTP ao ribossoma
Factores de libertação		
RF-1	36	Reconhece os codões de stop UAA e UAG
RF-2	38	Reconhece os codões de stop UAA e UGA
RF-3	46	Liga GTP e estimula a ligação de RF-1 e RF-2

A iniciação começa com a subunidade pequena do ribossoma, já que os ribossomas 70S ou 80S são inactivos e a sua dissociação espontânea sob condições fisiológicas processa-se a uma taxa muito lenta. O factor IF-1 de *E. coli* promove a dissociação dos ribossomas e o factor IF-3 evita a sua montagem, disponibilizando subunidades pequenas livres para a iniciação. O com-

plexo de iniciação formado é então adicionado à subunidade grande do ribossoma por libertação do factor IF-3.

A iniciação resulta, por isso, na formação de um complexo fMet-tRNA^{Met}.mRNA-ribossoma, em que o fMet-tRNA^{Met} ocupa o centro P do ribossoma, ao passo que o centro A está disponível para receber um aminoacil-tRNA. Note-se que o tRNA^{Met} é o único tRNA capaz de entrar directamente no centro P. Todos os outros tRNAs entram neste centro apenas depois de ocuparem o centro A durante o alongamento da cadeia.

Em termos gerais, a iniciação nas células eucariotas é muito semelhante à das procariontes, diferindo, no entanto, em muitos aspectos particulares. Assim, p. ex., os ribossomas eucariotas são assistidos por numerosos factores de iniciação (designados por eIF-*n*, com «e» derivado de eucariota); em alguns eucariotas, têm sido descritos mais de 10. O tRNA que reconhece o codão de iniciação é o Met-tRNA^{Met}, cujo resíduo de Met nunca se encontra formulado. De notar que os polipéptidos sintetizados pelos ribossomas dos mitocôndrios e dos cloroplastos das células eucariotas são iniciados com a *N*-formil-metionina. Os mRNAs eucariotas não possuem sequências complementares para a ligação do tipo Shine-Dalgarno ao rRNA 18S. Em vez disso, a tradução dos mRNAs eucariotas, invariavelmente monocistronicos, começa quase sempre no seu primeiro codão AUG. Deste modo, a subunidade 40S do ribossoma liga-se na extremidade 5' (ou muito próximo dela) do mRNA eucariota e migra para juzante até encontrar o primeiro codão AUG.

C) *Alongamento da cadeia polipeptídica* — O alongamento da cadeia polipeptídica pelo ribossoma decorre por um ciclo de três reacções que adiciona sucessivamente resíduos individuais de aminoácidos ao terminal C de um polipéptido nascente: a ligação do aminoacil-tRNA, a transpeptidação e a translocação. Cada aminoácido é levado para o ribossoma e posicionado correctamente pelo seu tRNA, o qual emparelha o seu anticodão com o codão correspondente do mRNA. Este ciclo repete-se tantas vezes quantos os resíduos de aminoácidos que são adicionados à cadeia polipeptídica nascente. Este mecanismo funciona a uma taxa que pode atingir 40 resíduos por segundo e é promovido e envolve a participação de várias proteínas, não-ribossomais, denominadas factores de alongamento (EF, do inglês *Elongation Factors*). A ligação de cada novo aminoacil-tRNA e o movimento do ribossoma ao longo do mRNA são facilitados pela hidrólise de duas moléculas de GTP por cada resíduo de aminoácido adicionado ao polipéptido nascente.

A reacção de ligação do aminoacil-tRNA ao ribossoma de *E. coli* inicia-se com a formação de um complexo ternário entre o subcomplexo binário GTP-factor de alongamento EF-Tu e o aminoacil-tRNA, o qual se liga ao ribossoma. Subsequentemente, numa reacção que envolve hidrólise do GTP a GDP + Pi, o aminoacil-tRNA forma um complexo do tipo codão-anticodão com o centro A do ribossoma e o complexo EF-Tu.GDP + Pi é libertado. Seguidamente, o GDP é removido do complexo EF-Tu.GDP pelo

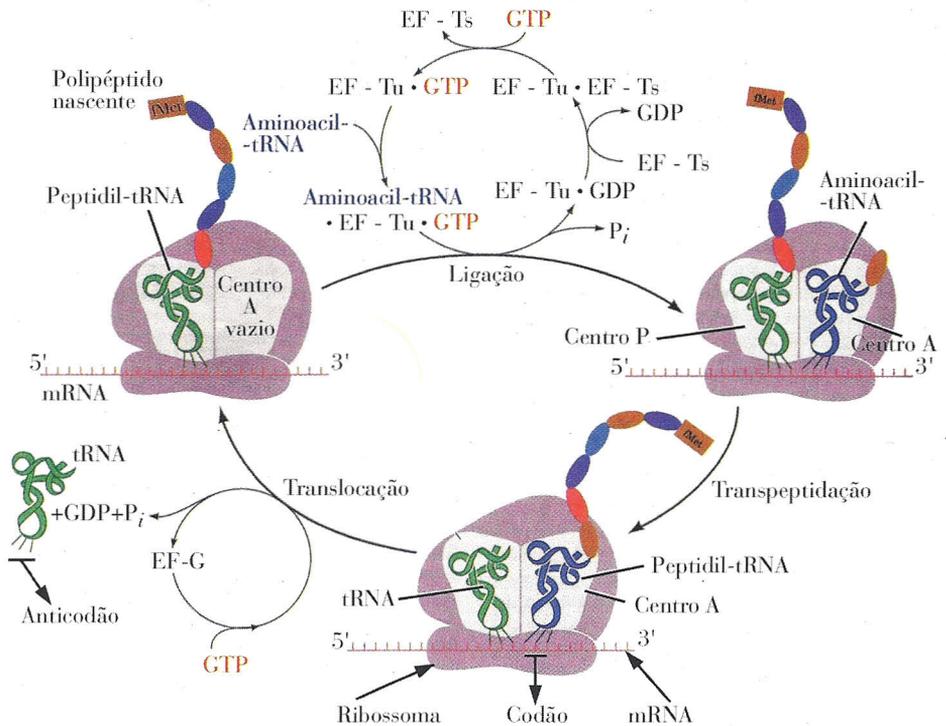
factor de alongamento EF-Ts que, por sua vez, é deslocado pelo GTP, regenerando o complexo EF-Tu.GTP.

Os aminoacil-tRNAs podem ligar-se directamente ao centro A do ribossoma sem a participação de EF-Tu, mas apenas a uma taxa demasiadamente baixa para permitir o crescimento celular. A importância de EF-Tu é, por isso, evidenciada pelo facto de ser a proteína mais abundante de *E. coli*. Está presente em c. 100 000 cópias por célula, constituindo mais de 5% da sua proteína total e aproximando-se do número de moléculas de tRNA celular. Consequentemente, o complemento celular de aminoacil-tRNAs encontra-se essencialmente sequestrado por EF-Tu.

O factor EF-Tu não se liga nunca ao Met-tRNA^{Met}, quer formilado quer não. Por este motivo, o tRNA iniciador nunca se liga a codões AUG ou GUG internos. A base estrutural desta discriminação em *E. coli* resulta do tRNA^{Met}, ao contrário dos outros tRNAs, não possuir um par de bases na extremidade que liga o aminoácido.

centro A do ribossoma faz a remoção nucleofílica do tRNA do peptidil-tRNA do centro P. Deste modo, a cadeia polipeptídica nascente é acrescentada em um resíduo de aminoácido no seu terminal C e transferida para o tRNA do centro A, num processo denominado transpeptidação. Esta reacção processa-se sem o consumo extra de energia, porque a ligação éster estabelecida entre o polipeptido nascente e o tRNA no centro P é uma ligação rica em energia.

A parte final da fase de alongamento consiste no movimento do ribossoma relativamente ao mRNA (o ribossoma desloca-se ao longo do mRNA na distância de um codão, no sentido da sua extremidade 3'), processo acompanhado pela translocação do peptidil-tRNA do centro A para o P. Assim, o tRNA não-acilado presente no centro P do ribossoma é transferido para o centro E e expelido na reacção de ligação subsequente. Por outro lado, o peptidil-tRNA presente no centro A é transferido para o centro P, conjuntamente com o mRNA a que está ligado. Este processo, denominado translocação, pre-

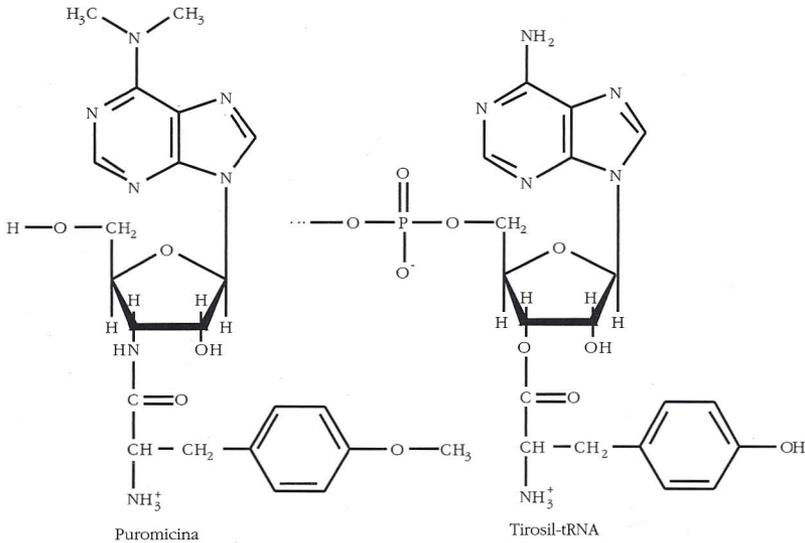


Ciclo de alongamento da cadeia polipeptídica nos ribossomas de *Escherichia coli*

A ligação peptídica é formada no ribossoma durante a segunda etapa da fase de alongamento: dá-se a reacção entre o grupo carboxilo do complexo presente no centro P e o grupo amina livre do complexo presente no centro A. A actividade enzimática que catalisa a formação das ligações peptídicas, denominada peptidil-transferase, foi inicialmente considerada como uma propriedade intrínseca de uma ou mais proteínas da subunidade grande do ribossoma. Contudo, Harry Noller e colaboradores descobriram, em 1992, que esta actividade não é catalisada por uma proteína mas sim pelo rRNA 23S. Neste processo, o grupo amina do aminoacil-tRNA do

para o ribossoma para o ciclo seguinte de alongamento. A translocação requer a participação do factor de alongamento EF-G (também denominado translocase), o qual se liga ao ribossoma na presença de GTP, sendo apenas libertado por hidrólise do GTP a GDP + Pi. A libertação do EF-G é um pré-requisito para o início do novo ciclo de alongamento, porque as ligações ao ribossoma do EF-G e do EF-Tu são mutuamente exclusivas.

O antibiótico puromicina, um análogo estrutural da extremidade 3' do Tyr-tRNA, bloqueia prematuramente a síntese da cadeia polipeptídica.



A puromicina apresenta uma estrutura análoga à do terminal 3' do tiroxil-tRNA

A puromicina, em competição com um aminoacil-tRNA mas sem necessitar da presença de factores de alongamento, liga-se ao centro A do ribossoma, o qual catalisa a reacção de transpeptidação normal para formar o peptidil-puromicina. Contudo, o ribossoma não consegue catalisar a reacção de transpeptidação no ciclo de alongamento seguinte porque o resíduo de aminoácido da puromicina está ligado ao seu «tRNA» por uma ligação do tipo amida, em vez de uma ligação éster. Isto provoca o aborto da síntese polipeptídica e a libertação da peptidil-puromicina.

O ciclo de alongamento das células eucariotas é muito semelhante ao das células procariotas. Nas primeiras, as funções do EF-Tu e EF-Ts são realizadas por duas subunidades diferentes do factor de alongamento eucariota eEF-1. Do mesmo modo, eEF-2 funciona de modo semelhante ao EF-G.

D) Terminação da cadeia polipeptídica — A tradução do mRNA termina com a formação de polipéptidos livres devido à presença no mRNA dos chamados codões de terminação: UAA, UGA e UAG. A entrada de um destes codões no centro A do ribossoma sinaliza o *términus* do polipéptido. Em *E. coli*, os codões de terminação, os únicos codões que não têm tRNAs que lhes correspondam, são reconhecidos por factores de libertação de natureza proteica (RF, do inglês *Release Factors*), os quais actuam a nível do centro A do ribossoma: o RF-1 reconhece UAA e UAG, ao passo que o RF-2 é específico para UAA e UGA. Nenhum deles se liga ao ribossoma em simultâneo com EF-G. Um terceiro factor de libertação, o RF-3, liga GTP, tem actividade de GTPase e estimula a ligação de RF-1 e RF-2 ao ribossoma.

A ligação de um factor de libertação ao codão de terminação apropriado induz a peptidil-transferase do ribossoma a transferir o grupo peptídico para a água em vez de para um aminoacil-tRNA, de que resulta a formação de um polipéptido e de um tRNA livre. O tRNA não-acilado resultante dissocia-se subsequentemente do ribossoma

e os factores de libertação são expelidos com a hidrólise concomitante de GTP a GDP + Pi. Daqui resulta um ribossoma inactivo que liberta o mRNA ligado, em preparação para um novo ciclo de síntese polipeptídica.

A terminação nos eucariotas é semelhante à dos procariotas, mas envolve um único factor de libertação, o eRF, que se liga ao ribossoma juntamente com o GTP e se liberta com a hidrólise deste a GDP + Pi. Tem, por isso, actividade de GTPase.

E) Enrolamento e processamento da cadeia polipeptídica — A estrutura de nível terciário da proteína começa a formar-se durante a síntese proteica, com a cadeia polipeptídica ainda incompleta e ligada ao ribossoma (**7** Proteínas). Em muitos casos, a proteína é também sujeita a outros tipos de reacções que a convertem na forma biologicamente activa — é a modificação pós-tradução das proteínas, em que pode ocorrer, p. ex., a ligação covalente de certos grupos químicos, como seja a adição de grupos acetilo, fosfato, metilo, carboxilo ou outros, a certos resíduos de aminoácidos, ou a ligação de oligosacáridos ou de grupos prostéticos ou a remoção de determinadas sequências de resíduos de aminoácidos, quer do terminal N do polipéptido quer do seu interior.

A taxa global de erro da síntese proteica é de c. 1 erro por cada 10⁴ aminoácidos incorporados, um valor consideravelmente superior ao encontrado na replicação do DNA. Isto resulta, possivelmente, de um erro na síntese proteica poder ser «apagado» por destruição da proteína por proteólise, não sendo perpetuado por passagem para as gerações seguintes. Este grau de rigor é suficiente para garantir que a maior parte das proteínas sintetizadas não contenham erros e que a grande quantidade de energia dispendida na síntese proteica raramente seja desperdiçada. A biossíntese de proteínas é um processo muito dispendioso em termos de fisiologia celular. São necessárias várias moléculas de ATP e de GTP para formar cada ligação peptídica. A síntese proteica pode consumir até 90% da energia qui-

mica usada pela célula em reacções biossintéticas. Na fase de activação dos aminoácidos, são hidrolisadas duas ligações fosfato do ATP no estabelecimento da ligação éster entre o aminoácido e o grupo 2'- ou 3'-OH do tRNA durante a formação enzimática do complexo aminoacil-tRNA. Outros ATPs são necessários sempre que aminoácidos incorrectamente activados são hidrolisados pela actividade de desacilação de algumas aminoacil-tRNA sintetases. Uma molécula de GTP é hidrolisada a GDP + Pi durante o primeiro passo da fase de alongamento e outro GTP é hidrolisado no passo da translocação. Outros ATPs e GTPs hidrolisados no decurso da biossíntese de proteínas servem para aumentar a precisão e o rigor do processo.

O funcionamento normal da S. P. implica a ocorrência de várias reacções de hidrólise de GTP. No entanto, a tradução ocorre na ausência de GTP, embora a uma taxa extremamente baixa, porque a energia livre libertada na reacção de transpeptidação é suficiente para mover ou fazer funcionar todo o processo da tradução. Por outro lado, nenhuma das reacções de hidrólise do GTP participa na formação de um composto rico em energia. A ligação alostérica do GTP induz alterações na conformação dos componentes ribossomais de modo a promover os diversos passos da síntese proteica. Estas alterações de conformação catalisam também a hidrólise de GTP, o qual permite ao ribossoma adquirir a sua conformação original. A taxa rápida e irreversível de hidrólise do GTP assegura que as diversas fases da síntese biológica ribossomal de proteínas se processem de forma rápida e irreversível.

Antibióticos são substâncias produzidas por bactérias ou fungos, que inibem o crescimento de outros organismos. A maioria dos antibióticos conhecidos, incluindo muitos com aplicação clínica, são inibidores de síntese proteica, bloqueando a tradução. Isto resulta, provavelmente, da enorme complexidade do aparelho de tradução, que o torna vulnerável à acção de muitos compostos. A tabela seguinte exemplifica vários antibióticos importantes do ponto de vista médico ou bioquímico.

R. BOAVIDA FERREIRA

BIBL.: D. Voet e J. G. Voet, *Biochemistry*, Nova Iorque, 1990; R. H. Garrett e C. M. Grisham, *Biochemistry*, Fort Worth, 1995.

proteínas alimentares — NUTR. As P. A. são desintegradas nos seus aminoácidos constituintes, durante a digestão e, de seguida, estes são absorvidos na sua quase totalidade. Os aminoácidos essenciais, aqueles que o organismo não tem condições para sintetizar, são aproveitados tal e qual pelas células para a produção das suas proteínas próprias. Os não essenciais, e os essenciais que excedem as necessidades, são decompostos nos seus constituintes químicos e com estes o organismo arranja as suas proteínas. Os materiais sobranes, e os que decorrem da degradação das proteínas estruturais, são catabolisados através de ciclos próprios (da ureia, do ácido úrico, etc.), ou são aproveitados para produzir glicídios (neoglicogénese); a energia resultante acumula-se como gorduras no tecido adiposo. De notar que as calorías provenientes de excessos proteicos são menos «engordantes» do que as provenientes de glicídios, e que as destes são-no muito menos do que as das gorduras alimentares.

Quando na alimentação faltam proteínas em quantidade suficiente ou, havendo-as, faltam porções suficientes e ajustadas de um qualquer ácido aminado essencial, o organismo sofre, adoece e pode morrer porque não dispõe de meios para sintetizar a sua matéria viva. Concluindo, para que os fornecedores proteicos sejam úteis, a alimentação deve fornecer combinações equilibradas de ácidos aminados essenciais, porções complementares de ácidos aminados não essenciais, quantidades suficientes de glicídios e o conjunto das vitaminas e minerais indispensáveis para regular os processos metabólicos que presidem à construção das proteínas orgânicas.

Nenhuma P. A. dispõe de uma sequência equilibrada e completa de aminoácidos capaz de satisfazer as necessidades do corpo, a não ser o leite materno para o bebé. Mas há proteínas muitíssimo boas, caso do ovo e do leite de vaca. No entanto, um bom aprovisionamento proteico não precisa de atender à qualidade individual de cada fornecedor possível; de facto, a ingestão simultânea de proteínas vegetais e animais de qualidades muito desiguais propicia conjuntos de grande qualidade. P. ex., as proteínas de trigo, feijão e hortaliça, uma a uma, são desequilibradas e incompletas quanto a aminoácidos mas, ingeridas em conjunto, equivalem em qua-

Exemplos de inibidores de síntese proteica

Inibidor	Acção
Cloranfenicol	Inibe a peptidil-transferase da subunidade grande do ribossoma procariota
Ciclo-heximida	Inibe a peptidil-transferase da subunidade grande do ribossoma eucariota
Eritromicina	Inibe a translocação na subunidade grande do ribossoma procariota
Ácido fusídico	Inibe o alongamento nos procariotas, por impedir a dissociação do complexo EF-G.GDP da subunidade grande do ribossoma
Puromicina	Um análogo estrutural do aminoacil-tRNA, que provoca a terminação prematura da cadeia polipeptídica em procariotas e eucariotas
Estreptomicina	Induz erros na tradução do mRNA e inibe a iniciação da cadeia polipeptídica em procariotas
Tetraciclina	Inibe a ligação dos aminoacil-tRNAs à subunidade pequena do ribossoma procariota
Toxina da difteria	Inactiva cataliticamente o eEF-2 por ADP-ribosilação
Ricina/abrina	Proteínas tóxicas de plantas que inactivam cataliticamente a subunidade grande do ribossoma eucariota

lidade às proteínas da carne, muito boas. Por esta razão, uma regra de ouro da alimentação saudável é variar o mais possível de alimentos. A carência proteica somada à falta global de comida gera a situação mais grave de fome — a proteína-calórica — que afecta barbaramente 800 000 000 de pessoas. O medo da fome e os seus horrores marcaram o pensamento de várias gerações de cientistas e sanitaristas, que tudo fizeram para disponibilizar grandes rações proteicas às populações mais carecidas do Mundo. Sabemos hoje que é desnecessário e até contra-productivo. O máximo de saúde pede valores entre 0,8 g e 1,2 g de P. A. por quilo e dia; rações superiores a 1,5 g, sabemos-lo hoje, são potencialmente perigosas. Isto significa, nas sociedades afluentes, a necessidade de comer francamente menos carne e peixe do que o habitual. Para quem pratica uma equilibrada alimentação saudável, com riqueza variada de produtos vegetais, leguminosas, pão de boa qualidade (escuro de mistura) e produtos lácteos bastam diariamente entre 120 g e 150 g de carne e peixe para assegurar um fornecimento mais do que suficiente de P. A.

EMÍLIO PERES

proteínases — BIOQ. As P., também denominadas enzimas proteolíticas, endopeptidases ou peptidil-péptido hidrolases, constituem um dos dois grandes grupos em que se subdividem as \propto peptidases. São englobadas nas subsubclasses de EC 3.4.21 a EC 3.4.99. Catalisam a hidrólise de ligações peptídicas no interior da cadeia peptídica, originando a formação de péptidos de tamanho variável. A sua divisão em subsubclasses é feita com base no seu mecanismo catalítico, sendo a sua especificidade utilizada apenas para identificar as enzimas individuais dentro de cada grupo. [\propto Proteases. \propto Proteases (Inibidores de).]

R. BOAVIDA FERREIRA

proteoglicanas — BIOQ. São glicoproteínas de elevada massa molecular, usualmente localizadas externamente à célula, fazendo parte de estruturas extracelulares tanto de animais (matriz extracelular) como de plantas (parede celular) e podendo estar associadas mais ou menos fortemente à membrana plasmática. Têm grande importância nos mucos e tecidos estruturais dos animais (substância intersticial, cartilagens, ossos), contribuindo para as propriedades de elevada viscosidade, elasticidade e resistência à acção de agentes infecciosos. Podem formar enormes

agregados (massa molecular global de c. 2 000 000 de dalton nas cartilagens), apresentando-se com a estrutura de escovilhão, na qual uma longa cadeia de ácido hialurónico constitui a unidade central onde se ligam proteínas glicosiladas com numerosas estruturas curtas de \propto mucopolissacáridos (condroitino-sulfatos, ceratana-sulfatos). Nas plantas, uma importante classe de P. é a das proteínas de arabinogalactana (ou AGPs) presentes nas paredes celulares, onde têm funções estruturais e, possivelmente, também regulatórias. São altamente glicosiladas, representando o hidrato de carbono c. 95% do peso total da molécula. A uma proteína central com domínios ricos em hidroxiprolina ligam-se cadeias de galactana altamente ramificada e contendo algumas unidades de arabinose. Algumas AGPs apresentam similaridades das suas sequências com \propto extensinas, lectinas de solanáceas e \propto proteínas PR. Concentrações particularmente altas de AGPs são encontradas nos estiletos de muitas flores. A sua função está longe de ser bem compreendida.

C. PINTO RICARDO

proteo-hormonas — BIOQ. São proteínas, frequentemente glicosiladas, com função hormonal. São, por isso, sintetizadas por tradução dos mRNAs correspondentes e degradadas por acção de proteases. Apresentam massas moleculares normalmente compreendidas entre 5 e 25 kDa no caso das P.-H. monoméricas, ou massas moleculares superiores no caso das P.-H. multiméricas. A distinção entre P.-H. e \propto péptidos hormonais é, por vezes, pouco clara. São exemplos de P.-H. a coriogonadotropina, a hormona estimuladora dos foliculos, a hormona luteinizante, a tireotropina e a insulina.

R. BOAVIDA FERREIRA

proteólise — BIOQ. É a degradação de uma \propto proteína, normalmente por hidrólise de uma ou mais das suas \propto ligações peptídicas. Pode ser catalisada por enzimas denominadas \propto proteases ou ocorrer, p. ex., por acção de ácidos fortes (e. g. 6 M HCl a 110°C durante 24 h ou mais) ou alcalis. A P. pode ser extracelular, como acontece, p. ex., durante a digestão da dieta alimentar nos animais superiores ou com a coagulação do sangue, ou intracelular. A P. intracelular é levada a cabo pelos lisossomas (vacúolos no caso das células vegetais e de leveduras) ou por vias especializadas e selectivas de degradação proteica, como a via proteolítica mediada pela \propto ubiquitina.

Formação de proteínas biologicamente activas a partir dos seus precursores inactivos por proteólise limitada

Precursor inactivo	Massa molecular (kDa)	Número de resíduos de aminoácidos	Proteína activa	Massa molecular (kDa)	Número de resíduos de aminoácidos
Fibrinogénio	340	3400	Monómero de fibrina	327	~3270
Pepsinogénio	42,5	362	Pepsina	34,5	327
Procarboxipeptidase A	90	850	Carboxipeptidase A	34,3	307
Proinsulina	9,1	84	Insulina	6	51
Protrombina	72	560	Trombina	39	309
Pro-renina	36,2	321	Renina	30,7	272
Quimotripsinogénio	25,7	245	Quimotripsina A	25,2	241
Tripsinogénio	24	229	Tripsina	23,4	223

A P. completa de uma proteína leva, em última instância, à libertação dos aminoácidos livres que a constituem. Contudo, no processo da P., muitas proteases cortam as proteínas-substrato em fragmentos peptídicos de pequenas dimensões. Nas células animais danificadas, as catepsinas são libertadas dos lisossomas em ruptura e são responsáveis pela autólise, i. é, pela degradação total e não-selectiva da proteína da célula. No entanto, a P. pode ser limitada, situação em que apenas determinadas ligações peptídicas da proteína são hidrolisadas. Isto resulta normalmente na produção de proteínas ou péptidos biologicamente activos (p. ex.: hormonas ou enzimas) ou inactivos (p. ex.: para- κ -caseína). A P. limitada é, deste modo, responsável pela activação dos α zimogénios e pela libertação de algumas proteo-hormonas ou hormonas peptídicas.

R. BOAVIDA FERREIRA

proteoma — BIOL. Conceito recente, conceptualizado em 1995 por Wilkins e colaboradores, que designa o conjunto dos produtos proteicos correspondentes ao genoma de um organismo. Considerando que há muitas interações entre as proteínas e que há muitas mais proteínas do que genes, o estudo do P. é mais complexo do que o estudo do genoma, visando obter informação sobre as sequências das proteínas (após as várias modificações pós-traducionais que poderão ter ocorrido) e as interações proteína-proteína que modulam o metabolismo. Portanto, não será de estranhar que esteja a ser bastante intensificado o estudo do P., sendo ainda de realçar o contributo que esta metodologia tem tido na descoberta de efeitos epigenéticos (alteração na expressão de um gene que conduz à alteração do fenótipo sem que seja alterada a sequência de DNA).

O estudo do P. permite o conhecimento momentâneo do conteúdo proteico de qualquer organismo, célula ou tipo de tecido, pelo que é mais fácil a identificação de tais efeitos a este nível do que ao nível genómico. As informações assim obtidas podem posteriormente ser comparadas a fim de se identificarem as proteínas que sofreram alterações. O estudo do P., enquanto instrumento de investigação da expressão genética, é posterior a dois importantes avanços tecnológicos, a divulgação através da *World Wide Web* de elevado número de sequências genómicas e as melhorias introduzidas na técnica de espectrometria de massa. É, assim, possível a rápida identificação de proteínas presentes em pequenas quantidades. O P. não é, portanto, o estudo individual das proteínas, como tradicionalmente tem sido feito, mas sim uma análise automatizada realizada em larga escala. Isto requer permanentes melhorias tecnológicas, continuando a fazer-se um esforço considerável no desenvolvimento de novos instrumentos para o estudo do P.

O P. procura enumerar e caracterizar as proteínas, comparar as variações nos seus níveis de expressão, estudar as suas interações e identificar os seus papéis funcionais, já que o comportamento de uma proteína isolada é muito diferente da sua função no complexo celular envolvente.

Kano e colaboradores, em 1995, publicaram um vasto trabalho sobre o P. da planta-modelo *Arabidopsis*. Nos anos seguintes o P. emergiu em várias áreas da biologia, juntamente com a sequencição de vários genomas, como uma abordagem complementar à análise da expressão do genoma a nível do RNA mensageiro (mRNA). A análise do P. é uma técnica que permite identificar novos genes. A recente conclusão da sequencição do primeiro genoma de plantas reforçou o interesse pela identificação dos produtos dos genes (as proteínas).

O P. pode ser utilizado em estudos de fisiologia e de genética. Neste contexto, têm sido abordadas alterações da expressão do genoma desencadeadas por factores ambientais (p. ex. em plantas) ou de doenças (p. ex. em animais). Um estudo original do P. foi proposto em 1999 por Kerr e colaboradores ao investigarem como é que as proteínas do floema se distribuem diferencialmente nos órgãos de carregamento (*source*) e nos de descarregamento (*sink*). Embora algumas proteínas fossem observadas independentemente do local em que o floema era analisado, verificou-se que outras eram específicas da região analisada do exsudado, o que demonstra que o floema não pode ser considerado como um componente de um compartimento uniforme. Uma das mais recentes abordagens da aplicação do P. a estudos de fisiologia das plantas foi realizado em 2000 por Plomion e colaboradores, os quais caracterizaram e identificaram as proteínas envolvidas nas alterações da estrutura da parede celular e que estão associadas à compressão da madeira das árvores. Os autores caracterizaram, no pinheiro marítimo, o P. do xilema em diferenciação. A análise da expressão dos perfis de 137 proteínas do xilema e a análise das variações quantitativas nos caracteres mecânicos e bioquímicos da madeira permitiram definir diferentes grupos de proteínas, tendo mesmo sido possível identificar sequências metabólicas especializadas em que certas dessas proteínas participavam.

O P. também é bastante importante na caracterização genética de *loci* de caracteres quantitativos. Como exemplo pode referir-se o mapeamento dos *loci* quantitativos correspondentes às proteínas do milho que se expressam em condições de seca.

Para além da identificação de novas proteínas, um importante objectivo do P. é a organização dos dados obtidos e existentes em bases de dados. Recentemente, foram constituídas duas bases de dados relativas a plantas que oferecem enormes possibilidades informáticas. São elas a base de dados do pinheiro marítimo, acima referida, e a do P. da membrana plasmática de *Arabidopsis*. Verifica-se assim que está a aumentar o interesse pelo estudo do P. tanto de animais como de plantas, não se restringindo às espécies que habitualmente são usadas como modelos. Para além disso, é importante a tentativa de introduzir a proteómica funcional na análise de processos específicos das plantas como resposta a vários factores bióticos e abióticos.

Os estudos do P. têm, em grande medida, sido efectuados por electroforese bidimensional (2D), técnica descrita pela primeira vez em 1974. Esta metodologia permite separar e detectar milhares

de polipéptidos presentes numa mistura complexa de proteínas, ao associar ortogonalmente duas formas de separação, primeiro pela carga (focagem isoeléctrica) e depois pelo tamanho (migração em gel de poli(acrilamida)). Tradicionalmente esta técnica envolve a solubilização da amostra em tampões compatíveis com a focagem isoeléctrica (usada na primeira dimensão da separação electroforética) com posterior análise de imagem dos conjuntos diferencialmente obtidos no gel final da segunda dimensão e terminando com a excisão das manchas polipeptídicas. Segue-se o tratamento dos polipéptidos excisados de modo a que possam ser identificados ou sequenciados por espectrometria de massa (MS) e a interpretação de dados das proteínas identificadas. Esquemáticamente ter-se-á: Preparação da amostra → Electroforese 2D → Análise de imagem → Excisão da mancha e digestão → Identificação dos polipéptidos → Cristalografia e ressonância magnética nuclear, para análise de estrutura proteica/função.

A electroforese 2D tem, no entanto, um grande obstáculo que resulta da necessidade de, para diferentes amostras, comparar pelo menos dois ou mais géis. Apesar dos grandes avanços técnicos, que possibilitam uma grande reprodutibilidade entre os géis, continua ainda a ser impossível sobrepor directamente dois géis e obter alinhadas as mesmas manchas polipeptídicas. Com efeito, considerando que dificilmente dois géis polimerizam do mesmo modo, este erro é sistemático, ocasionando flutuações pontuais aleatórias.

Para superar esta falta de reprodutibilidade inerente à electroforese 2D comum, esta tem sido utilizada segundo um procedimento diferencial, habitualmente designado por DIGE (Diference Gel Electrophoresis). Nesta técnica, duas amostras diferencialmente marcadas com corantes fluorescentes (à base de cianina e de amina reactiva) migram no mesmo gel. Assim, com este sistema electroforético, todos os polipéptidos idênticos se sobrepõem à sua cópia diferencialmente marcada nas duas amostras fluorescentes resultantes do mesmo gel, permitindo uma maior reprodutibilidade e uma mais fácil detecção das diferenças. A DIGE é uma técnica sensível, capaz de detectar um único polipéptido presente em duas amostras diferentes e em níveis tão baixos como 0,01% (p/p) da proteína total, tendo uma sensibilidade de detecção total semelhante à obtida com o nitrato de prata.

Melhorias técnicas na MS e noutras metodologias oferecem, todavia, alternativas na análise do P. que se afiguram mais expeditas do que a electroforese 2D, permitindo chegar rapidamente a resultados. Com efeito, a MS associada à transformada de Fourier (FTMS) tem vindo a afirmar-se como uma técnica poderosa na análise de misturas muito complexas de proteínas, sem qualquer separação prévia ou apenas limitada. A MS em sequência (ou *tandem*) e a cromatografia multidimensional permitiram identificar para cima de um terço dos produtos do genoma da levedura numa única experiência. Estas metodologias, em associação com ICAT (*isotope coded affinity tags*), oferecem novos caminhos para a quantificação automática de proteínas, com a vantagem de não excluírem certas

classes de proteínas (como sejam as proteínas de membranas), apresentando-se assim como alternativas à electroforese 2D. Mas para além dos avanços técnicos ligados à rápida identificação das proteínas é preciso não esquecer que um componente crucial do P. é a sua vertente biológica associada à identificação das funções celulares das proteínas. Consequentemente, é fundamental continuar a desenvolver novas estratégias de «marcação» de proteínas e de análise das interacções proteína-proteína que ocorrem *in vivo*.

MARIA MANUELA VELOSO

BIBL.: J. Kehr, S. Haebel, Blechschmidt, S. Schneider, L. Willmitzer, M. Steup e J. Fisahn, «Analysis of phloem protein patterns from different organs of *Cucurbita maxima* Duch by matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectroscopy combined with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis», em *Planta* 207, 612-619, 1999; H. Thiellement, N. Bahman, C. Damerval, C. Plomion, M. Rossignol, V. Santoni, D. Vienne e M. Zivy, «Proteomics for genetic and physiological studies in plants», em *Electrophoresis* 20, 2013-2026, 1999; M. Unlu, «Difference gel electrophoresis», em *Biochemical Society Transactions* 27, 547-549, 1999; S. Borman, «Proteomics: Taking over where genomics leaves off», em *Chemical & Engineering News* (July 31), pp. 31-37, Washington, 2000; M. J. Dutt e K H Lee, «Proteomic analysis», em *Current Opinion in Biotechnology* 11, 176-179, 2000.

Proteróglifas — ZOOL. Grupo de serpentes que compreende os *Elapidae* terrestres e os *Hydrophüdae* marinhos e que são possuidoras de dentes de veneno, quasi não móveis, colocados na porção anterior da maxila, não se modificando praticamente a posição destes dentes durante a mordedura. Estes dentes venenosos estão rodeados por uma prega da mucosa da gengiva, que constitui o receptáculo a que aflui o ducto das glândulas de veneno, escoando-se este por profundas caleiras escavadas nos mesmos dentes venenosos. O veneno destas serpentes é sempre muito tóxico. Com as serpentes ∇ solenóglifas, constituem os ofídeos mais perigosos para a espécie humana.

PAULO MARQUES

proterozóico (grupo) — GEOL. Conjunto de terrenos correspondentes à Era Proterozóica, ou seja, a mais recente das duas Eras Pré-Câmbricas. São, por esse facto, terrenos, em geral, menos metamorfizados do que os do grupo anterior, Arqueozóico ou Arcaico. As duas séries reúnem-se sob o nome de Era Criptozóica, i. é, Era em que a vida existia, mas cujos vestígios são muito escassos.

CARLOS TEIXEIRA

prótese — MED. Qualquer utensílio destinado a substituir a ausência congénita ou adquirida de um órgão ou segmento corpóreo ou a corrigir deformações ósseas traumáticas ou adquiridas e defeitos de certos órgãos dos sentidos. A substituição pode:

- ser meramente estética (p. ex., P. ocular, auricular, capilar, mão estética, etc.) (fig. 5);
- suprir a função ausente na sua totalidade ou quase (p. ex., P. mandibular implantada cirurgicamente, do membro inferior, etc.);
- realizar um efeito combinado, funcional e estético (p. ex., P. dentária);