

ESTUDO COMPARATIVO DE INIBIDORES DE QUIMIOTRIPSINA
EM TRÊS CULTIVARES DE *Vigna sinensis* (L.) SAVI

Maria Ary Ruschel

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários
à obtenção do grau de
MESTRE EM BIOQUÍMICA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CENTRO DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

1979

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição do material contido nesta dissertação é permitida desde que se faça a citação apropriada.

Maria Ary Ruschel

DISSERTAÇÃO APROVADA POR:

José Xavier Filho
Orientador da Dissertação

Data

Renato de Azevedo Moreira

Data

Maria da Guia Silva Lima

Data

Ao meu marido, AURO, e minha filha, JULIANA

Ao meu pai, JEAN, e meu irmão, JOSÉ

*Em memória de minha mãe, CARMEM, e meu ir-
mão, FRANCISCO*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. José Xavier Filho, pela orientação permanente e criteriosa assim como pelo estímulo constante sempre presentes em todas as etapas deste trabalho o meu sincero e profundo reconhecimento.

Aos professores Renato de Azevedo Moreira e Maria da Guia Silva Lima, pelas sugestões e discussões importantes apresentadas em várias fases deste trabalho.

A todos os professores, colegas e demais funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo ambiente de trabalho, cooperação e incentivo.

De modo especial sou grata ao meu marido Auro José Ruschel que indiretamente muito colaborou para a execução deste trabalho, como também a todas pessoas que de alguma forma deram sua contribuição.

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de bolsa de Pós-Graduação.

Coordenação do Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), através de bolsa de Pós-Graduação e de convênio com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Organização dos Estados Americanos (OEA), através de convênio com o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, em cujos laboratórios esta dissertação foi realizada.

ÍNDICE GERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xi
ABREVIATURAS USADAS	xii
SUMÁRIO	xiv
I. INTRODUÇÃO	1
II. MATERIAIS E MÉTODOS	12
1. MATERIAIS	12
1.1. Sementes	12
1.2. Outros materiais	12
2. MÉTODOS	13
2.1. Métodos Preparativos	13
2.1.1. Extrações	13
2.1.1.1. Extração para análise quan- titativa	13
2.1.1.2. Extração para análise qua- litativa	14
2.1.1.3. Extração para purificação dos inibidores.....	14
2.1.2. Preparação de SEPHAROSE 4B-Quimio- tripsina	15
2.1.3. Cromatografias	16
2.1.3.1. Cromatografia de afinidade	16
2.1.3.1.1. Determinação da capacidade da coluna	16

2.1.3.1.2. Cromatografia preparativa ...	17
2.1.3.2. Cromatografia de troca iônica	17
2.1.3.3. Cromatografia de exclusão.	18
2.2. Métodos Analíticos	18
2.2.1. Determinação de proteína	18
2.2.2. Determinação da atividade de proteínas e inibidores	18
2.2.2.1. Atividade trípica	19
2.2.2.2. Atividade quimiotrípica .	19
2.2.2.3. Atividade dos inibidores .	20
2.2.3. Eletroforeses em gel de poliacrilamida	20
2.2.3.1. Eletroforese em gel de pH 8.1	20
2.2.3.2. Eletroforese em gel com SDS	21
2.2.3.3. Eletroforese em gel com SDS e β -ME	22
2.2.4. Espectro de absorção	22
2.2.5. Focalização isoeétrica em placas de gel de poliacrilamida	23
III. RESULTADOS	25
1. Descrição das sementes	25
2. Análise quantitativa dos inibidores de tripsina e quimiotripsina	25

3. Análise qualitativa dos inibidores de tripsina e quimiotripsina em extratos brutos	27
4. Isolamento e purificação dos inibidores	27
4.1. Escolha do método de extração	27
4.2. Curva de saturação	32
4.3. Isolamento por SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina	32
4.4. Purificação em DEAE-celulose	38
5. Caracterização e propriedades dos inibidores ..	38
5.1. Eletroforese em gel de pH 8.1	38
5.2. Eletroforese em gel com SDS	44
5.3. Eletroforese em gel com SDS e β -ME	44
5.4. Espectro de absorção	49
5.5. Focalização isoelétrica	49
IV. DISCUSSÃO	55
V. CONCLUSÕES	60
VI. BIBLIOGRAFIA	61
VII. COMUNICAÇÕES A CONGRESSOS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Eletroforese em gel de pH 8.1 de extratos brutos dos três cultivares	28
2.	Esquema de obtenção dos extratos parcialmente purificados	31
3.	Curva de saturação	34
4.	Cromatografia em SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina com solução saturante de extrato parcialmente purificado do cultivar seridô	35
5.	Cromatografia em SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina com solução saturante de extrato parcialmente purificado do cultivar pitiúba	36
6.	Cromatografia em SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina com solução saturante de extrato parcialmente purificado do cultivar quebra-cadeira	37
7.	Cromatografia de SII em DEAE-celulose	39
8.	Cromatografia de PII em DEAE-celulose	40
9.	Cromatografia de QII em DEAE-celulose	41
10.	Eletroforese em gel de pH 8.1 de IQSII, IQPII e IQQII	43
11.	Eletroforese em gel com SDS de IQSII, IQPII e IQQII	45
12.	Eletroforese em gel com SDS e β -ME de IQSII, IQPII e IQQII	47
13.	Espectro de absorção de IQSII na região do ultravioleta	50

Figura	Página
14. Espectro de absorção de IQP11 na região do <u>ultra</u> violeta	51
15. Espectro de absorção de IQQ11 na região do <u>ultra</u> violeta	52
16. Focalização isoelétrica em placas de gel de poli acrilamida de IQS11, IQP11 e IQQ11 usando tripsi na para revelação dos inibidores	53
17. Focalização isoelétrica em placas de gel de po liacrilamida de IQS11, IQP11 e IQQ11 usando qui miotripsina para revelação dos inibidores	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela	Página
I. Análise quantitativa de proteínas e dos inibidores de tripsina e quimiotripsina dos três cultivares	26
II. Rf em eletroforese em gel de pH 8.1 dos inibidores de tripsina e quimiotripsina dos três cultivares	29
III. Análise quantitativa de proteínas e dos inibidores de tripsina e quimiotripsina em cinco diferentes extratos do cultivar seridô	30
IV. Atividades antitriptica e antiquimiotriptica de extratos parcialmente purificados do cultivar seridô e de frações SI e SII	33
V. Frações e rendimento obtidos por cromatografia em DEAE-celulose	42
VI. Peso molecular dos três inibidores por eletroforese em gel com SDS	46
VII. Peso molecular das espécies detectadas por eletroforese em gel com SDS e β -ME dos três inibidores	48

ABREVIATURAS USADAS

- TCA - ácido tricloroacético
- DEAE - dietilaminoetil
- TRIS - 2-amino-2-hidroxi-metil-1,3-propanodiol ou tris (hidroxi-metil) aminometano
- APNE - N-Acetil-DL-fenilalanina- β -naftil-ester
- SDS - sódio dodecil sulfato
- β -ME - β -mercaptoetanol
- Rf - mobilidade eletroforética relativa
- UI - unidades de inibidor
- UIQ - unidades de inibidor de quimiotripsina
- UIT - unidades de inibidor de tripsina
- IQ - inibidor de quimiotripsina
- EA - extrato obtido por extração de farinha de sementes do cultivar seridô com água destilada
- EB - extrato obtido por extração de farinha de sementes do cultivar seridô com tetraborato de sódio contendo NaCl 0,3 M
- EAT - extrato obtido por extração de farinha de sementes do cultivar seridô com água destilada e precipitação posterior por TCA 2,5%
- EBT - extrato obtido por extração de farinha de sementes do cultivar seridô com tetraborato de sódio contendo NaCl 0,3 M e precipitação posterior por TCA 2,5%
- EAA - extrato obtido por extração de farinha de sementes do cultivar seridô com água destilada seguida por adição de ácido acético 40%
- SI - fração não retida pela coluna de SEPHAROSE 4B-Quimio tripsina após a aplicação de extrato parcialmente purificado do cultivar seridô
- PI - fração não retida pela coluna de SEPHAROSE 4B-Quimio tripsina após a aplicação de extrato parcialmente pu-

- rificado do cultivar pitiúba
- QI - fração não retida pela cõluna de SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina apõs a aplicaçãõ de extrato parcialmente purificado do cultivar quebra-cadeira
- SII - fração antiquimiotrípica e antitrípica isolada por SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina a partir do cultivar seridõ
- PII - fração antiquimiotrípica e antitrípica isolada por SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina a partir do cultivar pitiúba
- QII - fração antiquimiotrípica e antitrípica isolada por SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina a partir do cultivar quebra-cadeira
- IQSII - inibidor de quimiotripsina/tripsina do cultivar seridõ isolado por SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina e purificado em DEAE-celulose
- IQPII - inibidor de quimiotripsina/tripsina do cultivar pitiúba isolado por SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina e purificado em DEAE-celulose
- IQQII - inibidor de quimiotripsina/tripsina do cultivar quebra-cadeira isolado por SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina e purificado em DEAE-celulose

SUMÁRIO

Sementes de três cultivares de *Vigna sinensis* (L.) Savi, seridô, pitiúba e quebra-cadeira foram analisadas no que diz respeito ao seu conteúdo de inibidores de tripsina e de quimiotripsina.

Um inibidor de quimiotripsina que também possui atividade antitriptica presente nos três cultivares foi isolado e purificado. O método empregado foi o de cromatografia de afinidade, utilizando-se uma coluna de SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina e purificação posterior em DEAE-celulose.

Os três inibidores possuem o mesmo peso molecular associado após eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, assim como o mesmo pI (4,72) determinado por focalização isoeletrica em placas de gel de poliacrilamida. Para os três inibidores a atividade antitriptica foi mais resistente à redução por β -ME que a atividade antiquimiotriptica. O mesmo peso molecular mínimo de 11.000 daltons também foi encontrado. Os inibidores apresentaram espectros de absorção semelhantes na região do ultravioleta com variações nos seus coeficientes de extinção. Diferenças também foram encontradas no número e posições de bandas protéicas, após eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β -ME. Apesar de que nos três inibidores foram detectados componentes em posições correspondendo a pesos moleculares de 22.000, 16.500 e 11.000 daltons, também foram reveladas outras espécies de pesos moleculares menores que o considerado mínimo. Essas pequenas moléculas certamente foram formadas durante a etapa de cromatografia de afinidade.

Os inibidores de quimiotripsina/tripsina dos três cultivares de *Vigna sinensis* parecem possuir uma composição de aminoácidos semelhante, diferindo provavelmente por um número pequeno de resíduos.

I. INTRODUÇÃO

Seres vivos de grande diversificação como microorganismos, insetos, vegetais superiores e mamíferos, apresentam compostos idênticos, mecanismos e reações metabólicas semelhantes: todas as células utilizam polifosfatos, particularmente adenosina trifosfato, em seus processos energéticos; vários compostos como lipídios, carboidratos e proteínas são sintetizados e degradados através de uma seqüência de reações similares na maioria das células; as proteínas são sintetizadas por um processo complexo, sendo a seqüência de aminoácidos de cada uma determinada pela seqüência de nucleotídios do seu gene. Três nucleotídios consecutivos (codon) especificam um aminoácido. Esta correspondência aminoácido-codon é a mesma para todos os organismos estudados.

A única explicação razoável para essas semelhanças bioquímicas, em nível tão detalhado, é que os seres vivos atuais foram originados de um mesmo ancestral comum, através do processo de evolução. Em outras palavras, a preservação dinâmica das entidades bioquímicas das células vivas foi tão rigorosa como a preservação de fósseis sedimentares. Conseqüentemente, o fenômeno da evolução orgânica pode ser melhor ilustrado por esses aspectos bioquímicos que por evidências morfológicas, embriológicas ou fósseis. Esse ancestral comum foi denominado de protoorganismo, e infere-se que ele já possuía capacidade para codificar suas próprias proteínas. Uma vez que, antes das complexas proteínas, os organismos devem ser capazes de fabricar ácidos nucléicos, o protoorganismo provavelmente descendeu de uma entidade química que podia replicar seus ácidos nucléicos. Com base nesses detalhes bioquímicos podemos concluir que ocorreram várias eras de evolução relacionadas ascendentemente ao longo do tempo: evolução da orga-

nização química, evolução dos ácidos nucléicos, evolução do código genético (protoorganismo), evolução do reino animal e do reino vegetal (1).

A caracterização de compostos químicos como as proteínas tem-se mostrado muito útil em investigações taxonômicas e filogenéticas (2). Assim, a comparação da seqüência de aminoácidos de proteínas homólogas, em diferentes organismos, contém mais informações que centenas de tratados morfológicos (1,2,3). No entanto, esse tipo de investigação, especialmente ao nível de gênero e espécie, envolve comparação de grande número de organismos e métodos rápidos de análise de proteína são requeridos. Como estudos da seqüência de aminoácidos consomem bastante tempo, outras determinações mostram-se de grande utilidade, tais como a composição de aminoácidos e propriedades eletroforéticas.

Apesar de que a composição de certas proteínas de reserva encontradas em sementes é diferente em espécies distintas de legumes, algumas generalizações, dentro de uma família, podem ser evidenciadas. Fox em 1964 (4) determinou a composição de aminoácidos de proteínas de *Pisum arvense*, *P. sativum*, *Vicia sepium* e *V. pisiformis* e observou que a composição de aminoácidos entre duas espécies do mesmo gênero é mais semelhante que entre espécies de gêneros diferentes. A variação da composição de aminoácidos entre as espécies foi de aproximadamente 10%; enquanto que entre cinco diferentes cultivares de *Vicia faba* foi cerca de 5%.

As velocidades de evolução de proteínas diferentes variam muito (5). Uma explicação plausível para esse fato é que certos tipos de proteínas possuem restrições quanto às suas estruturas (primária, secundária, terciária) e desse modo apresentam maior resistência a variações que outras. Como exemplo temos o caso da hemoglobina "S", presente em indivíduos com anemia falciforme, que difere da hemoglobina normal

por um simples resíduo de aminoácido (3). As enzimas necessitam ter, no seu sítio ativo, certos aminoácidos, numa disposição singular necessária para a catálise. Assim, mutações que poderiam modificar a estrutura secundária ou terciária dessas enzimas, alterando o posicionamento desses grupos, naturalmente seriam rejeitadas durante o processo evolucionário. Por outro lado, essa variação de velocidade durante a evolução protéica pode ser também visualizada como uma função da composição de aminoácidos (6). Desta maneira, a maioria das proteínas que apresentam restrições nas suas estruturas secundária e terciária são suscetíveis a mutações, nas quais um aminoácido é substituído por outro aminoácido com propriedades semelhantes. Grupos hidrofóbicos internos podem ser substituídos por outros grupos hidrofóbicos; grupos polares externos podem ser substituídos por outros grupos polares.

Usando técnicas de eletroforese para comparação de algumas espécies de legumes, Fox e outros (7) mostraram que espécies do mesmo gênero apresentam padrões protéicos eletroforéticos mais semelhantes que espécies de gêneros diferentes. Para certas tribos, padrões eletroforéticos uniformes são obtidos quando são comparadas globulinas de diferentes membros da mesma tribo. Em outras tribos, apesar de que isso não seja possível, podemos distinguir, dentro de cada uma, subgrupos, cada um apresentando um padrão eletroforético comum (8). Também é possível utilizar esses padrões eletroforéticos para subdividir várias espécies dentro de um gênero. Trinta e seis espécies de *Crotalaria* apresentam padrões eletroforéticos de suas proteínas, que se correlacionam com as subdivisões do gênero, baseadas em caracteres morfológicos e citológicos (9). Em geral, parece existir uma relação estreita entre proximidade filogenética e semelhança das características de proteínas dos organismos estudados.

Substâncias de natureza protéica que possuem a propriedade de inibir a atividade proteolítica de certas enzi-

mas, os inibidores de proteinases constituem, por vários motivos, uma importante classe de proteínas para estudos de evolução:

a) Encontram-se amplamente distribuídos na natureza, ocorrendo em plantas e animais. No reino vegetal têm sido encontrados em várias famílias, principalmente em todas as leguminosas, em Gramíneas e Solanáceas (10,11,12,13). Eles ocorrem com mais frequência em sementes e tubérculos, mas não necessariamente se restringem a essas partes da planta. As folhas jovens da batata-doce (*Ipomoea batata*) e batata-inglesa (*Solanum tuberosum*) possuem grande quantidade de um inibidor de tripsina e de um inibidor de quimiotripsina, respectivamente (14). Todas as partes de *Phaseolus aureus* contêm inibidores de tripsina (15), assim como em todos os órgãos de sementes germinantes de *Vigna sinensis* (16).

No reino animal, além da sua ocorrência em mamíferos (inibidores de tripsina do suco pancreático, sangue, urina, colostro) podem ser encontrados em nematódios (um inibidor de tripsina e quimiotripsina de *Ascaris lumbricoides*) e nos ovos de certos pássaros (fração ovomucóide da clara do ovo) (11).

b) Os inibidores interagem com um grupo bem caracterizado de proteínas - as serina-proteinases. Dos inibidores de proteinases de origem vegetal os mais estudados têm sido os inibidores de tripsina. Muitos desses inibidores também inibem quimiotripsina, mas algumas vezes inibidores de quimiotripsina são inativos contra tripsina. Embora alguns desses inibidores de tripsina ou quimiotripsina sejam estritamente específicos, em certos casos podem inibir outras enzimas, como elastase, trombina, plasmina e calicreína (10,13,17).

c) Os inibidores apresentam grande estabilidade, são

fáceis de isolar e, devido ao seu pequeno tamanho, torna-se fácil determinar sua estrutura primária. A maioria dos inibidores não contém triptofano e metionina, contém prolina e alta percentagem de cisteína, formando ligações dissulfetos, que conferem à molécula uma extraordinária resistência ao calor, à hidrólise enzimática e a agentes químicos (18,19).

Os inibidores possuem peso molecular dentro de uma faixa de 4.000 a 80.000 daltons, geralmente abaixo de 50.000 e mais comumente abaixo de 20.000 daltons. A maior parte dos inibidores de origem vegetal contém entre 70 e 90 aminoácidos, correspondendo a pesos moleculares de 8.000 a 10.000, podendo estar associados como dímeros ou tetrâmeros (11,12,13).

Nortrhop e Kunitz, em 1931, foram os primeiros a chamar a atenção para a existência de inibidores, e esses mesmos autores isolaram o primeiro inibidor de tripsina, a partir do pâncreas bovino (10). Em 1938 Read e Haas primeiramente reconheceram a presença de um inibidor em vegetal, trabalhando com soja (*Glycine max*) e esta proteína (inibidor de Kunitz ou SBTI) foi posteriormente isolada por Kunitz em 1945 (14,16). Desde então muitos outros inibidores de tripsina têm sido isolados de diversos legumes: fava (*Phaseolus lunatus*), "garden bean" (*Phaseolus vulgaris*); feijão de corda (*Vigna sinensis*), "field bean" (*Dolichos lablab*) (20,21,22). Eles também foram isolados de outras fontes vegetais, como batata (*Solanum tuberosum*, inibidor de quimiotripsina I) e milho (*Zea mays*) (13,16). Algumas dessas fontes podem apresentar imensa diversidade de inibidores de proteinases. Dessa maneira, tem-se revelado em soja, além do conhecido inibidor de Kunitz a presença de múltiplos inibidores (AA, A₁, A₂, B₁ e B₂) (11, 16,18). Nos tubérculos de batata foram encontrados sete diferentes tipos de inibidores de proteinases, que podem ser distinguidos por seus pesos moleculares, composição de aminoácidos e especificidade (13). Vale salientar que muitos desses tipos de inibidores existem como iso-inibidores, formas essas

que apesar de apresentarem algumas distinções têm, na maior parte, propriedades semelhantes (12,13,23).

Comparações de inibidores puros, de origem vegetal, mostram aspectos interessantes. Inibidores isolados da mesma fonte, como SBTI e AA de soja possuem diferenças marcantes, na composição de aminoácidos, especificidade e suscetibilidade a vários tratamentos. Por outro lado, inibidores como SBTI e PCI (inibidor de quimiotripsina I da batata), derivados de fontes tão diversas, mostram similaridades nas suas composições de aminoácidos (24). A determinação da seqüência de aminoácido em certos inibidores de tripsina como SBTI, "lima bean I", "lima bean II" e "garden bean II" indica a existência de semelhanças estruturais (13,19). Essas análises proporcionam comparações em vários níveis taxonômicos e filogenéticos: intergenérico (*Phaseolus/Glicina*), interespecífico (*Phaseolus vulgaris/P. lunatus*) e intraespecífico (isoinibidores de *P. lunatus*).

d) Em contraste com outras proteínas, os inibidores ocasionalmente aceitam mutações no seu centro ativo, mesmo que isso resulte em mudança da sua especificidade. Os inibidores contêm sítios ativos, localizados dentro de uma alça dissulfeto, que variam de acordo com a sua especificidade. Aqueles específicos para tripsina possuem no seu centro ativo uma seqüência LIS-X ou ARG-X, enquanto no caso dos inibidores de quimiotripsina possuem normalmente LEU-X, TIR-X ou FEN-X (10,13,19,25). Determinação da seqüência de aminoácidos do inibidor de tripsina originário do pâncreas bovino (BPTI) e de outros três inibidores de fontes tão diversas como caramelo, tartaruga e víbora mostram homologia entre si (26,27). Particularmente interessante é a ausência de inserções e deleções, apesar da distância filogenética entre essas proteínas. Estudos detalhados das propriedades do BPTI indicam que poucos aminoácidos na vizinhança do seu centro ativo (LIS¹⁵-ALA¹⁶)

participam na ligação com proteínases e que a conservação desses resíduos é importante na manutenção da conformação da molécula e conseqüentemente na atividade inibitória (27). Todas essas evidências sugerem que os sítios ativos dos inibidores podem ter sido conservados através de milhões de anos de evolução, o que sugere que a capacidade inibitória é importante para a sobrevivência (12).

Com a utilização de métodos sintéticos, no entanto, obtém-se substituição dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo. Além disso, mutações que ocorrem no sítio ativo dos inibidores são ocasionalmente aceitas, mesmo que impliquem sérias mudanças da especificidade inibitória (26). A substituição de um resíduo de arginina (ARG⁶³) do centro ativo de SBTI por triptofano (TRI⁶³) revela que enquanto o inibidor-ARG⁶³ inibe tripsina fortemente e quimiotripsina fracamente, o Inibidor-TRI⁶³ mostra forte ação contra quimiotripsina, sendo praticamente inativo contra tripsina.

e) Existência de inibidores com mais de um centro ativo. Inibidores capazes de inibir mais de uma enzima, podem fazê-lo em sítios reativos separados, sendo denominados de inibidores de múltipla cabeça ("multi-headed") (26). Os dois centros ativos e distintos do inibidor de tripsina e quimiotripsina de fava ("lima bean") tipo dupla-cabeça ("double-headed") são homólogos e essa característica tem sido válida para diversos inibidores provenientes de legumes, como aquele isolado de grão de bico (13,28). Recentemente explicou-se a existência desses inibidores como resultado de uma elongação genética devido a uma multiplicação parcial ou completa de um gene existente para um inibidor com apenas um sítio ativo ("single-headed") (26). Sistemas que possuem esse tipo de comportamento são de grande interesse evolucionário.

Gennis e Cantor isolaram dois inibidores de dupla cabeça de feijão tipo "black-eyed pea" de *Vigna sinensis*,

variedade "redbow". Enquanto um deles inibe tripsina e quimio tripsina simultaneamente, o outro exibe um comportamento anômalo, uma vez que ambos os centros inibem tripsina, não tendo ação sobre quimiotripsina (29).

f) O par inibidor-enzima constitui um dos melhores exemplos onde a aceitação de uma mutação, numa determinada proteína, é condicionada à aceitação de uma mutação em outra proteína, com a qual a primeira proteína interage (26). Certos inibidores possuem habilidade para discriminar entre tripsina humana e bovina. O inibidor de Kunitz, apesar de mostrar forte ação contra a tripsina bovina, não inibe a tripsina catiônica humana, enquanto inibidores de origem bovina apresentam grande eficiência sobre a tripsina catiônica humana. Diante disso, os inibidores têm sido classificados em humanos (eficientes inibidores de tripsina humana) e não humanos (fracos inibidores de tripsina humana). Estudos de natureza filogenética indicam que essa discriminação é decorrente de fenômenos mutacionais. Mutações que originaram um inibidor tipo humano foram anteriores àquelas aceitas na obtenção de tripsina humana.

Os inibidores, além de constituírem um importante instrumento para o trabalho dos evolucionistas, têm sido objeto de interesse de outras linhas de pesquisa. Embora poucas afirmações possam ser feitas em relação aos papéis atribuídos aos inibidores, resultados obtidos por diversos grupos revelam significativos avanços na compreensão dos mesmos.

Os nutricionistas investigam sua provável influência no valor nutritivo das proteínas de origem vegetal. Tem sido observado que produtos de origem vegetal que contêm altos níveis de inibidores de proteinases provocam retardamento no crescimento de animais alimentados com esses produtos (16, 30). Usando-se inibidores de tripsina parcialmente purificados, como fonte de alimentação em ratos e pássaros, detectou-

-se hipertrofia pancreática e excessiva secreção de enzimas proteolíticas (11,13). Outros fatores tóxicos, no entanto, presentes em alimentos provindos de plantas, como fitohemaglutininas, fatores bociogênicos, antivitaminicos, glicosídeos cianogênicos também teriam influência em seu baixo valor nutritivo (30).

Os químicos consideram-nos, em suas reações com as enzimas, um interessante modelo para estudos de interação proteína-proteína. A maneira pela qual os inibidores se ligam a certas enzimas pode servir como excelente modelo para o estudo da interação proteína-proteína (14). Particularmente as serina-proteinases formam complexos muito estáveis com seus inibidores (18). Desses complexos inibidor-enzima, o mais estudado tem sido aquele formado entre a tripsina e o inibidor de Kunitz (SBTI) (19). Vários métodos, como fluorescência, bloqueamento químico de certos grupos na enzima ou no inibidor e determinação do espectro de absorção, têm sido utilizados com o intuito de esclarecer esse complexo mecanismo de interação. Entretanto a maioria das especulações acerca do problema serão resolvidas por resultados obtidos com estudos cristalográficos em raios-X, que atualmente se encontram em notável progresso (14,18).

Os fisiologistas vegetais procuram desvendar um possível papel dessas substâncias no metabolismo da planta. Avanços recentes têm sugerido papéis fisiológicos importantes para os inibidores nas plantas. Shain e Mayer (31) mostraram que um inibidor de proteinase presente em semente de alface possui ação contra a atividade proteolítica de uma enzima endógena, a qual posteriormente foi classificada como uma endopeptidase, com atividade semelhante à da tripsina. Enquanto a atividade da enzima aumentava ao longo da germinação, observou-se o desaparecimento do inibidor. Outros resultados semelhantes têm sido encontrados, sugerindo um possível papel de regulação de proteases endógenas (12,22,32).

Devido à existência dos inibidores, em grandes quantidades em órgãos de reserva, como sementes e tubérculos, eles também são considerados como fontes de proteínas de reserva para a planta (12).

Outra função importante, sugerida para os inibidores de proteinases, seria a de proteção das plantas contra o ataque de insetos e invasão de microorganismos (12,13). Em 1972 Green e Ryan (33) deram um grande avanço nesse campo, demonstrando que folhas de batata e tomate infectadas com um tipo de inseto que normalmente ataca esses vegetais, acumulam quantidades maiores de inibidor I que plantas controle. Mosolov e outros (34) mostraram que inibidores de proteinases de diversas plantas inibem a atividade de proteinases exógenas, produzidas por *Fusarium solani*, um fungo que produz alterações patogênicas nos vegetais. A presença nas plantas de proteínas específicas, capazes de inibirem proteases de agentes fitopatogênicos, pode ser considerada como parte de um mecanismo específico de defesa.

Os clínicos estudam a possibilidade da aplicação terapêutica desses inibidores em certas desordens orgânicas. Ativação prematura dos zimogênios proteolíticos no pâncreas pode ocasionar desordens inflamatórias como a pancreatite. Além disso, sabe-se que as proteinases estão envolvidas em vários outros processos patológicos, como reações alérgicas e choques metabólicos. Muitas investigações têm considerado a possibilidade do uso terapêutico dos inibidores de proteinases, para o tratamento dessas doenças, no controle da atividade dessas enzimas, atribuindo aos mesmos uma possível função de agentes reguladores (11).

Objetivos da Investigação

O número de cultivares de feijão-de-corda é bastante elevado, e apesar de existirem poucos resultados experimen

tais, acerca do comportamento desses materiais, no Nordeste brasileiro, alguns dados já revelaram que eles apresentam ampla variação quanto a caracteres morfológicos e agronômicos (35,36,37). Na obtenção de dados taxonômicos, a caracterização de entidades químicas como as proteínas tem sido de grande utilidade (2). Em particular, os inibidores de proteinases aparecem como uma importante classe de proteínas para o estudo da evolução (26).

Utilizando três diferentes cultivares de *Vigna sinensis*, pretendemos fazer um estudo comparativo dos inibidores de tripsina e quimiotripsina. Mais especificamente visamos ao isolamento, purificação e caracterização parcial de um inibidor de quimiotripsina que também inibe tripsina, presente nas três sementes utilizadas. Esse inibidor foi anteriormente isolado e parcialmente caracterizado nesse laboratório a partir de sementes de *Vigna sinensis* cv. seridô (22). O cultivar seridô foi classificado erroneamente, no trabalho de Ventura e Xavier Filho, como sendo do tipo "black-eyed pea". Dos três cultivares analisados, seridô, pitiúba e quebra-cadeira, apenas o último é, fenotipicamente, um "black-eyed pea".

Além do aspecto taxonômico e filogenético explorado pela presente investigação, o melhor conhecimento dos inibidores possibilitará uma maior compreensão do papel dessas substâncias, principalmente se considerarmos a sua ocorrência diante de uma variedade tão grande de sistemas biológicos.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. MATERIAIS

1.1. Sementes

No presente trabalho foram utilizadas sementes de feijão de corda *Vigna sinensis* (L.) Savi de três diferentes cultivares: seridô, pitiúba e quebra-cadeira. O cultivar quebra-cadeira foi classificado como sendo do tipo "black-eyed pea". As sementes dos cultivares seridô e pitiúba foram consideradas fenotipicamente semelhantes.

Todas essas sementes foram fornecidas pelo Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

1.2. Outros materiais

Caseína - Preparada segundo Hammarsten, E. Merck AG Darmstadt, Alemanha.

Tripsina bovina - Preparação duas vezes cristalizada, Nutritional Biochemicals Co. (NBCo), EUA.

α -Quimiotripsina bovina - Preparação três vezes cristalizada e liofilizada, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

N-Acetil-DL-fenilalanina- β -naftil-ester - Preparação cristalina (lote 460-0197), Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

O-Dianisidina tetrazotizada - E. Merck, Darmstadt, Alemanha.

Sepharose 4B-CNBr ativada - (lote 3537), Pharmacia, Uppsala, Suécia.

Anfólitos carreadores (pH 3-6) - LKB-PRODUKTER AB,
Suécia.

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

2. MÉTODOS

Através de exame visual, as sementes dos três cultivos em estudo foram analisadas quanto ao tamanho e cor do tegumento. Também procedeu-se a pesagem das sementes sem o tegumento, com amostras de 20 sementes.

2.1. Métodos preparativos

2.1.1. Extrações

2.1.1.1. Extração para análise quantitativa

As sementes de feijão, livres do tegumento, foram trituradas em gral até obtenção de uma farinha de granulação igual a 20-40 mesh (20-40 malhas por polegada linear). Essa farinha foi submetida a extração com tampão fosfato 0,005 M contendo NaCl 5%, pH 7.0, durante 60 minutos à temperatura ambiente, utilizando-se uma relação de 1:10 (massa:volume). Após esse tempo de contacto a suspensão foi centrifugada a 8.000 x g durante 30 minutos, a 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante recolhido. Nos extratos assim obtidos, foi avaliada inicialmente a concentração de proteína, usando-se o método do microbiureto (38). Em seguida, através do ensaio caseinolítico de Kunitz (39) foram determinadas as atividades antitriptica e antiqumiotriptica.

2.1.1.2. Extração para análise qualitativa

Farinha das sementes de feijão sem tegumento foi obtida por moagem em moinho Wiley através de peneiras de 20 e 40 malhas por polegada linear (20 e 40 mesh). Tampão glicina-TRIS de pH 8.1 [glicina 2,9 g, TRIS 0,6 g, HCl 1 N (0,5 ml) e 97,5 ml de água destilada] foi usado como solução extratora. As extrações para os cultivares seridô e pitiúba foram feitas na relação 1:5 (massa:volume), enquanto que para o cultivar quebra-cadeira a relação de extração foi de 1:10 (massa:volume). Após um período de extração de 60 minutos, as suspensões foram centrifugadas a 8.000 x.g durante 30 minutos, a 4°C. Os precipitados foram desprezados e os sobrenadantes foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8.1.

2.1.1.3. Extração para purificação do inibidor

Este experimento foi realizado com a finalidade de selecionar um método de extração, no qual fosse obtido um extrato parcialmente purificado, ao mesmo tempo que apresentasse um maior rendimento da atividade inibitória. Foram utilizadas apenas sementes do cultivar seridô. Essas sementes foram moídas em moinho Wiley, através de peneiras de 20 e 40 mesh. Foi feita extração em água destilada ou em tetraborato de sódio 0,1 M, contendo NaCl 0,3 M, pH 8.0, numa relação de 1:10 (massa:volume) por 60 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida as suspensões foram centrifugadas durante 30 minutos a 8.000 x g e temperatura de 4°C. Os precipitados foram desprezados. O sobrenadante recolhido naquela extração, onde água destilada foi usada como solução extratora, foi denominado de extrato aquoso (EA). Quando a solução extratora foi tetraborato de sódio 0,1 M contendo NaCl 0,3 M, pH 8.0 o sobrenadante recebeu a denominação de EB. O extrato EA foi submetido a ambos os tratamentos abaixo, enquanto EB foi submetido somente

ao primeiro tratamento descrito a seguir:

1) adição de TCA 100%, de modo que as soluções ficassem com uma concentração final de 2,5% de ácido, seguida por um repouso de 30 minutos, após o que as suspensões foram centrifugadas a $8.000 \times g$ por 30 minutos a $4^{\circ}C$. Os precipitados foram desprezados e o sobrenadante recolhido a partir de EA foi denominado de EAT, e aquele proveniente de EB foi denominado de EBT.

2) ajuste à pH 4.0 com ácido acético 40%, seguido por um repouso de 30 minutos. A suspensão resultante foi centrifugada a $8.000 \times g$ por 30 minutos a $4^{\circ}C$. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante denominado EAA.

A concentração de proteínas e as atividades anti-trípica e anti-quimiotríptica foram determinadas nos cinco extratos obtidos, EA, EB, EAT, EBT e EAA.

2.1.2. Preparação de SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina

SEPHAROSE 4B ativada por CNBr (7,5 g) foi entumescida e lavada quatro vezes com HCl 1mM, utilizando-se um total de 1.500 ml dessa solução. O gel foi posteriormente lavado com 200 ml de água destilada e a seguir com 200 ml de tetraborato de sódio 0,5 M, pH 9.0, com o auxílio de um funil de placa porosa. A quimiotripsina (210 mg) a ser acoplada à SEPHAROSE foi dissolvida em 10,5 ml de tetraborato de sódio 0,05 M, contendo $CaCl_2$ 0,01 M, pH 9.0. Em seguida a SEPHAROSE foi adicionada à solução de quimiotripsina com agitação durante cerca de 15 horas a uma temperatura de $4^{\circ}C$. Após acoplamento, a SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina foi lavada com 400 ml de tetraborato de sódio 0,05 M, contendo $CaCl_2$ 0,01 M, pH 9.0 e em seguida com 200 ml de NaCl 0,5 M, contendo $CaCl_2$ 0,01 M, também em funil de placa porosa. A SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina foi

então equilibrada no mesmo funil com acetato de sódio 0.1 M, contendo NaCl 0.3 M e CaCl_2 0.01 M, pH 4.0, até que o pH do efluente atingisse um valor constante, igual a 4.0.0 método de preparação da SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina utilizado acima é descrito em Cechová (40). O gel foi armazenado a 4°C, em presença de tolueno, até sua utilização, quando então foi empacotado numa coluna de vidro, medindo 14,5 x 1,3 cm, sob a ação da gravidade.

2.1.3. Cromatografias

2.1.3.1. Cromatografia de afinidade

2.1.3.1.1. Determinação da capacidade da coluna

Com a finalidade de se conhecer a capacidade máxima de retenção de inibidores da coluna de SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina, foi obtida uma curva de saturação da coluna acima preparada. Para isso foi utilizado apenas extrato parcialmente purificado do cultivar seridô. Foram feitas diversas cromatografias de afinidade, empregando-se volumes crescentes da amostra aplicada, nos quais as atividades antitriptica e anti-quimiotriptica eram conhecidas. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 50 ml de acetato de sódio 0,1 M, contendo NaCl 0,3 M, pH 4.0, utilizando-se um fluxo de 65 ml/hora, sendo recolhidas frações de 6.0 ml. O material preso na coluna foi deslocado após lavagem com 100 ml da solução de HCl 0,01 M, contendo NaCl 0,3 M. A eluição foi realizada, utilizando-se um fluxo de 30 ml/hora, sendo recolhidas frações de 2,8 ml. A absorbância em 280 nm dos efluentes foi determinada para cada fração. As frações não retidas e aquelas deslocadas ao final do processo cromatográfico foram reunidas, e ambas as atividades antienzimáticas determinadas.

2.1.3.1.2. Cromatografia preparativa

A preparação dos inibidores de quimiotripsina foi feita utilizando-se a mesma coluna usada para a obtenção da curva de saturação. Um volume adequado de extrato, parcialmente purificado de cada cultivar ajustado a pH 4.0 e contendo 8700 UIQ, foi aplicado na coluna de SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina. O mesmo esquema de eluição, descrito anteriormente, foi utilizado nesta fase preparativa. As soluções eluídas nos tubos, referentes às frações de interesse no presente trabalho, foram reunidas, desalinizadas em SEPHADEX G-25 e liofilizadas.

2.1.3.2. Cromatografia de troca iônica

Cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose foi utilizada para purificar as amostras provenientes das cromatografias em SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina. DEAE-celulose, após suspensão em água, para retirada das partículas finas, foi empacotada sob a ação da gravidade, em uma coluna de vidro, medindo 12 x 1,3 cm. O adsorvente foi então lavado com 100 ml de água destilada. Em seguida a coluna foi equilibrada com 100 ml de tampão fosfato 0,05 M pH 7.0 e posteriormente com 200 ml de tampão fosfato 0,005 M, pH 7.0. As amostras (soluções de 5 mg/ml de tampão fosfato 0,005 M, pH 7.0), originadas das cromatografias de SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina foram dialisadas contra o mesmo tampão de equilíbrio da coluna a 4°C durante 15 horas. Em seguida, essas soluções foram centrifugadas a 8.000 x g por 30 minutos a 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante aplicado na coluna. Após a aplicação da amostra, a eluição foi feita inicialmente com o tampão de equilíbrio da coluna e a seguir com um gradiente retilíneo de concentração salina (NaCl 0,2-0,8 M - 75 + 75 ml) no mesmo tampão. Foi mantido um fluxo da ordem de 50 ml/hora e frações de

2,5 ml foram recolhidas com o auxílio de um coletor automático. A absorvância dos efluentes em 280 nm foi determinada. Para cada fração observada determinou-se a atividade antitriptica e antiqumiotriptica expressas em UI/ml. As soluções eluídas nos tubos correspondentes às frações que apresentaram ambas as atividades foram reunidas, dessalinizadas em SEPHADEX G-25 e liofilizadas.

2.1.3.3. Cromatografia de exclusão

Esse tipo de cromatografia foi empregado para efeito de dessalinização das amostras obtidas nas cromatografias de afinidade e de troca iônica. Foram utilizadas duas colunas de tamanho diferentes, preparadas com gel de dextrana SEPHADEX G-25 (32,0 x 3,7 cm e 16,5 x 2,2 cm) dependendo da quantidade de amostra a ser aplicada. As colunas foram montadas, deixando-se o gel sedimentar por gravidade. Para eluição das amostras utilizou-se água destilada.

2.2. Métodos analíticos

2.2.1. Determinação de proteína

A concentração de proteínas nos efluentes de colunas cromatográficas foi avaliada através de determinação de suas absorvâncias em 280 nm. Em outros casos, utilizou-se o método do microbiureto (38), usando-se albumina sérica bovina como padrão. Em ambas as análises foi utilizado um espectrofotômetro Beckmann, modelo DU.

2.2.2. Determinação da atividade de proteinases e inibidores

2.2.2.1. Atividade trípica

Foram preparadas soluções-estoque de tripsina em HCl 0,0025 M cuja concentração foi determinada através das leituras de absorvância à 280 nm usando-se $F_{280}^{1 \text{ mg/ml}} = 0,621$ (41). As soluções continham de 345 a 379 $\mu\text{g/ml}$. Para determinação da atividade trípica, caseína foi usada como substrato, segundo o método de digestibilidade de Kunitz (39). A solução-estoque de tripsina foi diluída em HCl 0,0025 M para uma concentração de aproximadamente 11,5 a 12,6 $\mu\text{g/ml}$. A volumes crescentes dessa solução diluída foi adicionado 1 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 7.6, os quais eram completados para 2 ml com HCl 0,0025 M. As soluções assim obtidas foram incubadas com caseína 1%, preparada em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.6. Após 20 minutos a reação era detida com TCA 5% e após 30 minutos a temperatura ambiente as suspensões foram filtradas, sendo retirado 1 ml do filtrado e neutralizado com 0,05 ml de NaOH 2 N. A determinação da atividade enzimática foi avaliada, empregando-se o reagente de Folin, modificado por Lowry e outros (42). A densidade ótica foi determinada num espectrofotômetro Spekol a 750 nm. Provas em branco de concentrações extremas de tripsina foram preparadas, sendo que nesse caso a adição de TCA sempre precedia à de caseína. Correções para concentrações intermediárias das provas em branco foram obtidas por extrapolação.

2.2.2.2. Atividade quimiotrípica

Foram preparadas soluções-estoque de quimiotripsina em água destilada e cuja concentração foi medida através das leituras de absorvância a 280 nm, usando-se $F_{280}^{1 \text{ mg/ml}} = 0,500$ (39). As soluções continham de 355 a 380 $\mu\text{g/ml}$. A atividade enzimática foi determinada, seguindo-se o ensaio caseinolítico de Kunitz (39) pelo mesmo processo descrito para determina

ção da atividade trípica. Água destilada foi usada em substituição à solução de HCl 0,0025 M.

2.2.2.3. Atividade dos inibidores

A atividade inibitória foi avaliada por comparação de amostras, contendo quantidades crescentes de inibidor em presença de uma quantidade constante de enzima com amostras contendo somente enzima. Foram feitas provas em branco da enzima, bem como das concentrações extremas de inibidor. As concentrações intermediárias foram determinadas por extrapolação. O método usado foi o de Kunitz (39) já descrito, e as atividades antitripica e antiqumiotripica foram expressas em unidades de inibidor (UI), definidas por Xavier Filho (43).

2.2.3. Eletroforeses em gel de poliacrilamida

2.2.3.1. Eletroforese em gel de pH 8.1

Eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8.1 foi feita de acordo com a técnica de Clarke (44). Nos experimentos para análise qualitativa foram aplicados 25 μ l dos extratos obtidos conforme descrito no item 2.1.1.2. por coluna de gel. No que diz respeito às frações isoladas por SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina e DEAE-celulose a quantidade de proteína aplicada era da ordem de 25 a 100 μ g por coluna de gel. Todos os experimentos foram efetuados a temperatura ambiente (25-28°C) com voltagem constante (200 volts). No processo de coloração utilizou-se negro de amido a 1% em ácido acético 7% durante 60 minutos. O descoramento foi feito por difusão em ácido acético 7%.

A detecção de inibidores de tripsina e quimiotripsina em gel de poliacrilamida a pH 8.1 foi feita de acordo com as técnicas descritas por Uriel e Berges (45) e Kaiser e

Belitz (46). O procedimento do experimento foi o seguinte: após eletroforese normal, os geis foram retirados dos tubos de vidro e incubados a 37°C por 30 minutos com uma solução de tripsina (0.1 mg/ml em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4) ou com uma solução de quimiotripsina (0,05 mg/ml no mesmo tampão). Terminado o período de incubação, os geis eram lavados seis vezes com água destilada e reincubados a 37°C, livres de solução, por 30 minutos. Após esse segundo período de incubação, os cilindros de gel foram imersos em uma mistura de APNE (2,5 mg/ml de dimetilformamida) com uma solução de o-dianisidina tetrazotizada em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4 (0,55 mg/ml), na proporção de 1:9. Passados 30 minutos, os geis eram lavados com ácido acético 7%. Nestes experimentos 25 µl dos extratos obtidos, conforme já descrito no item 2.1.1.2., foram aplicados por coluna de gel. No que diz respeito às frações isoladas por SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina e DEAE-celulose a quantidade de proteína aplicada era da ordem de 1 µg por gel.

2.2.3.2. Eletroforese em gel com SDS

Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS foi feita segundo Weber e Osborn (47). Material isolado por SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina e DEAE-celulose foi dissolvido em tampão fosfato 0,01 M, pH 7.0, contendo SDS 2%, resultando soluções com concentrações finais de 1 mg/ml das quais foram aplicadas cerca de 25 a 100 µl por gel. A eletroforese foi desenvolvida com corrente constante e igual a 7mA por coluna de gel, durante 4 horas.

As bandas de proteínas foram localizadas com negro de amido 1%, sendo o excesso de corante retirado com uma solução descorante que consistia de 75 ml de ácido acético glacial, 50 ml de álcool metílico e 875 ml de água destilada.

Também foram efetuadas com as amostras citadas acima eletroforeses em gel de poliacrilamida com SDS para visua-

lização de inibidores de tripsina e quimiotripsina. Nesse segundo tipo de experimento seguiu-se a técnica descrita por Xavier Filho e Moreira (48). Para caracterização dos inibidores de tripsina e quimiotripsina em gel com SDS foi aplicado aproximadamente 1 μ g de proteína por gel.

2.2.3.3. Eletroforese em gel com SDS e β -ME

A metodologia usada nesse tipo de experimento foi praticamente a mesma descrita para eletroforese em gel de poli(acrilamida) com SDS, tanto para localização das bandas de proteínas como para detecção dos inibidores de tripsina e quimiotripsina. A diferença existente consistiu na preparação da amostra a ser aplicada à qual foi adicionado β -mercaptoetanol 1%, 24 horas antes da corrida eletroforética com aquecimento a 100°C durante 10 minutos.

As amostras previamente reduzidas por β -ME foram aplicadas de modo a obter-se 100 a 200 μ g de proteína por coluna de gel. Nos experimentos de visualização de inibidores de tripsina e quimiotripsina foram aplicadas cerca de 1 a 5 μ g de proteína após redução por β -ME em cada gel.

2.2.4. Espectro de absorção

Espectros de absorção na região do ultravioleta dos inibidores purificados em SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina e DEAE-celulose foram feitos utilizando-se soluções contendo de 0,5 a 1,185 mg/ml em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.6. Os espectros foram determinados manualmente utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico em um espectrofotômetro Beckmann, modelo DU.

2.2.5. Focalização isoeletrica em placas de gel de poli acrilamida

Nos experimentos de focalização isoeletrica foi utilizado essencialmente o método de Awdeh e outros (49) e Xavier Filho e Souza (50). O gel foi preparado utilizando-se água destilada, uma solução de acrilamida (30%) contendo bis-acrilamida (1%), mistura de anfólitos (pH 3-10, 40%) e persulfato de amônio (1%) na proporção de 80:30:3:7. Esta solução assim preparada foi aplicada com o auxílio de uma pipeta "Pasteur" entre duas placas de vidro (12 x 9 cm) espaçadas por fitas elásticas de 0,5 mm de espessura e mantidas em posição por outras duas fitas elásticas. Após polimerização uma das placas de vidro foi retirada ficando o gel preso à outra placa. As amostras foram então aplicadas no lado do cátodo e a focalização desenvolveu-se durante 4 horas, numa câmara úmida. A quantidade de proteína aplicada foi cerca de 10 µg por amostra. A voltagem máxima utilizada foi de 100 volts. Após a corrente ter alcançado um mínimo, cerca de 0,5 mA, o gel foi deslocado da placa e uma tira longitudinal de 1 cm de largura foi retirada do mesmo e cortada em partes de 0,5 cm, que foram eluídas com 2 ml de água destilada durante 15 horas em tubos de ensaio. O pH foi então medido e o gradiente construído. A visualização dos inibidores de tripsina e quimiotripsina baseou-se no processo de coramento negativo descrito por Uriel e Berges (45) e Xavier Filho e Souza (50). O gel era posto em contacto com uma solução de tripsina (0,1 mg/ml em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4) ou com uma solução de quimiotripsina (0,05 mg/ml em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4) durante 30 minutos. O gel era então lavado duas vezes com água destilada sendo em seguida submerso na mistura de APNE (2,5 mg/ml em dimetilformamida) com uma solução de o-dianisidina tetrazotizada em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4 (0,55 mg/ml) na proporção de 1:9, durante um período de 30 minutos. Em seguida o

gel foi lavado duas vezes com a seguinte solução descorante: ácido acético glacial (75 ml), metanol (50 ml) e água destilada (875 ml). TCA 15% também foi utilizado para revelação das bandas de proteína, após o que o gel era imerso em uma solução de "Coomassie Blue" 0,1% em 75 ml de etanol, 186 ml de água destilada, 30 g de TCA e 9 g de ácido sulfosalicílico. Nesse segundo tipo de experiência aplicou-se cerca de 200 µg de proteína.

III. RESULTADOS

1. DESCRIÇÃO DAS SEMENTES

As sementes dos cultivares seridô e pitiúba apresentaram-se semelhantes do ponto de vista morfológico. Possuem um tegumento de cor castanha, sendo que nas sementes do cultivar seridô essa coloração tem um tom mais acentuado. No que diz respeito às sementes do cultivar quebra-cadeira, elas diferem marcadamente das outras duas. Possuem um tegumento de cor branca, apresentando uma mancha preta na região ao redor do hilo. As sementes dos cultivares pitiúba e quebra-cadeira são quase do mesmo tamanho enquanto as sementes do cultivar seridô apresentam-se um pouco maiores. A massa de cada semente (sem o tegumento) dos três cultivares seridô, pitiúba e quebra-cadeira foi, respectivamente 0,227 g, 0,170 g e 0,179 g.

2. ANÁLISE QUANTITATIVA DOS INIBIDORES DE TRIPSINA E QUIMIO-TRIPSINA

Os dados obtidos nesta análise estão apresentados na Tabela I. A concentração de proteína apresentou uma variação muito pequena entre os três diferentes cultivares.

Os inibidores de tripsina e quimiotripsina dos cultivares seridô e pitiúba encontram-se em quantidades comparáveis (diferenças estatisticamente não significativas). Entretanto no cultivar quebra-cadeira ambos tipos de inibidores foram encontrados em valores superiores, cerca de 2 a 3 vezes, aos outros dois. Consequentemente o cultivar quebra-cadeira apresentou uma atividade específica mais elevada que os cultivares seridô e pitiúba, para ambos tipos de inibidores.

CULTIVAR	mg proteína/g semente		mg proteína/semte	
	$\mu \pm \delta$	C.V.	$\mu \pm \delta$	C.V.
SERIDÓ	178,30 \pm 17,26	9,68	39,95 \pm 3,12	7,80
PITIÚBA	184,70 \pm 15,76	8,53	31,52 \pm 2,50	7,90
Q. CADEIRA	175,34 \pm 1,51	0,86	30,30 \pm 1,95	6,44

A

CULTIVAR	UIT/g semente		UIT/semte		UIT/mg proteína	
	$\mu \pm \delta$	C.V.	$\mu \pm \delta$	C.V.	$\mu \pm \delta$	C.V.
SERIDÓ	2456,36 \pm 68,66	2,79	554,87 \pm 23,00	4,15	13,78 \pm 0,33	2,50
PITIÚBA	2190,65 \pm 149,70	6,83	374,06 \pm 28,60	7,65	11,86 \pm 0,38	3,41
Q. CADEIRA	5703,44 \pm 233,90	4,10	996,35 \pm 103,54	10,39	32,53 \pm 1,08	3,33

B

CULTIVAR	UIQ/g semente		UIQ/semte		UIQ/mg proteína	
	$\mu \pm \delta$	C.V.	$\mu \pm \delta$	C.V.	$\mu \pm \delta$	C.V.
SERIDÓ	978,06 \pm 20,88	2,13	219,03 \pm 4,61	2,10	5,48 \pm 0,55	12,47
PITIÚBA	855,48 \pm 172,48	20,16	146,11 \pm 28,60	19,57	4,63 \pm 0,55	12,47
Q. CADEIRA	2255,42 \pm 9,65	0,43	393,36 \pm 24,62	6,26	12,86 \pm 0,13	1,01

C

Tabela 1 - Análise quantitativa de proteínas (A) e inibidores de tripsina (B) e quimiotripsina (C) presentes nas sementes de *Vigna sinensis* (L.) Savi dos três cultivares, seridó, pitiúba e quebra-cadeira. $\mu \pm \delta$ = média \pm desvio padrão, C.V. = coeficiente de variação. Cada valor representa 4 determinações.

3. ANÁLISE QUALITATIVA DOS INIBIDORES DE TRIPSINA E QUIMIO-TRIPSINA EM EXTRATOS BRUTOS

Eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8.1 foi utilizada para visualização das bandas de proteína e de inibidores de tripsina e quimiotripsina. A figura 1 mostra os resultados obtidos. Nos três cultivares analisados foi revelada a presença de quatro bandas correspondentes a inibidores de tripsina e somente uma de inibidor de quimiotripsina. Os valores de Rf dessas bandas estão mostrados na Tabela II. O componente antitriptico de maior mobilidade eletroforética e o único componente antiquimiotriptico encontrado foram considerados idênticos.

4. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS INIBIDORES

4.1. Escolha do método de extração

Análises quantitativas de proteínas e das atividades antitriptica e antiquimiotriptica foram feitas nos diferentes extratos EA, EB, EAT, EBT e EAA obtidos conforme descrito anteriormente. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela III. Apesar de EAT ter apresentado um maior grau de purificação, a extração com tetraborato de sódio 0,1 M contendo NaCl 0,3 M, pH 8.0 e posterior precipitação com TCA 2,5% (EBT) foi escolhida como método inicial de purificação. Essa escolha teve como base o maior rendimento em ambos os tipos de inibidores e a presença do NaCl o qual é conhecido por diminuir interações não específicas durante as cromatografias de afinidade. Vale também salientar que EBT no que diz respeito ao grau de purificação encontra-se imediatamente abaixo de EAT. Este método de extração encontra-se esquematizado na figura 2.

(-)

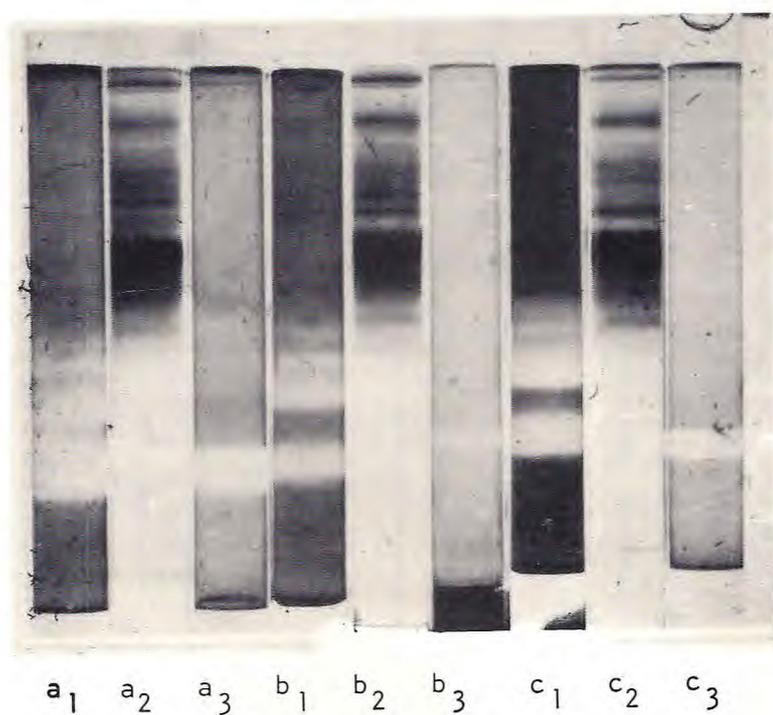


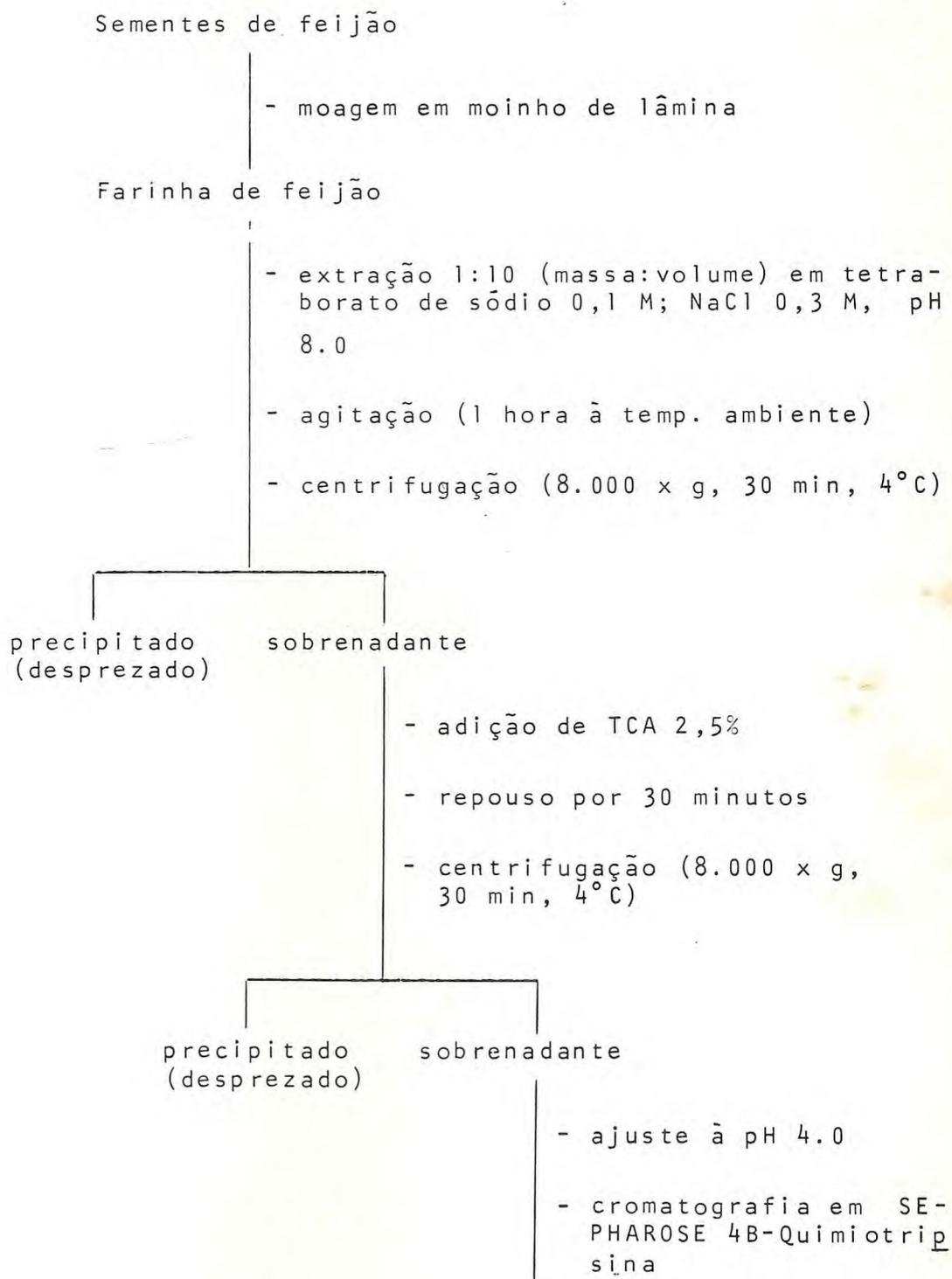
Figura 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8.1 dos extratos de sementes dos cultivares: seridõ (a₁, a₂, a₃), pitiúba (b₁, b₂, b₃) e quebra-cadeira (c₁, c₂, c₃). As bandas de proteína (a₂, b₂, c₂) foram coradas com negro de amido. Na visualização dos inibidores os geis a₁, b₁ e c₁ foram tratados com tripsina e os geis a₃, b₃ e c₃ com quimiotripsina.

CULTIVAR	INIBIDORES (Rf)									
	IT ₁		IT ₂		IT ₃		IT ₄		IQ	
	$\mu \pm \delta$	C.V.								
SERIDÃO	0,84 ± 0,013	1,55	0,71 ± 0,017	2,39	0,61 ± 0,005	0,82	0,57 ± 0,01	1,75	0,85 ± 0,012	1,17
PITIÚBA	0,85 ± 0,012	1,41	0,69 ± 0,014	2,03	0,63 ± 0,016	2,54	0,57 ± 0,03	5,26	0,85 ± 0,014	1,65
Q. CADEIRA	0,82 ± 0,008	0,99	0,68 ± 0,008	1,17	0,57 ± 0,008	1,40	0,53 ± 0,008	1,51	0,89 ± 0,00	0,00

Tabela II - Cálculo dos Rf dos quatro inibidores de tripsina (IT) e do inibidor de quimio tripsina (IQ) detectados nos extratos brutos dos três cultivares. Os inibidores de tripsina (IT₁, IT₂, IT₃, IT₄) foram numerados em ordem decrescente de acidez. $\mu \pm \delta$ = média ± desvio padrão, C.V. = coeficiente de variação. Cada valor representa 4 determinações.

Extratos	mg proteína/g semente	UIT/g semente	UIQ/g semente	UIT/mg proteína	UIQ/mg proteína
EA	182,00	2214,30	301,42	12,16	1,66
EB	201,70	2631,80	579,90	13,05	2,88
EAT	34,32	1158,70	225,68	33,76	6,57
EBT	66,91	1380,96	235,37	20,64	3,52
EAA	38,91	584,10	110,06	15,00	2,83

Tabela III - Análise quantitativa de proteínas e dos inibidores de tripsina e quimiotripsina feita em cinco diferentes extratos utilizando sementes do cultivar seridô, para escolha do método de extração usado na purificação dos inibidores de quimiotripsina.



FRAÇÃO ANTIQUIMIOTRÍPTICA E ANTITRÍPTICA

Figura 2 - Esquema de obtenção utilizado na purificação do inibidor de quimiotripsina a partir de sementes dos três cultivares, seridô, pitiúba e quebra-ca-deira.

4.2. Curva de saturação

Para obtenção da curva de saturação da coluna de SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina com inibidores da enzima utilizou-se apenas extrato parcialmente purificado das sementes do cultivar seridô. A Tabela IV mostra os resultados obtidos durante essa análise e a curva de saturação é mostrada na Figura 3. De acordo com essa curva observa-se que quando se aplicavam 8700 UIQ o ponto de saturação era atingido. Os perfis gráficos mostram a existência de duas frações principais SI, fração não retida e SII, fração retida e eluída com ácido clorídrico. A fração SII resultante de cromatografia com solução saturada continha 5750 UIQ, o que demonstra a ocorrência de perda considerável de material com atividade inibitória (28%), mesmo computando-se a pequena quantidade de IQ na fração SI ($\pm 6\%$).

4.3. Isolamento por SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina

As Figuras 4, 5 e 6 mostram gráficos das cromatografias de afinidade dos três cultivares, obtidas com soluções saturantes de extratos parcialmente purificados. Observam-se nos gráficos a existência das duas frações já referidas anteriormente para o cultivar seridô. Essas frações foram denominadas de SI e SII, PI e PII, QI e QII respectivamente, para os cultivares seridô, pitiúba e quebra-cadeira. O rendimento das frações II, foi de 0,125, 0,133 e 0,600 mg/g de farinha para seridô, pitiúba e quebra-cadeira. Essas frações, assim isoladas, foram acumuladas obtendo-se ao final SII, 50 mg; PII, 30 mg e QII, 30 mg.

R900H27

	CROMATOGRAFIAS						
	A	B	C	D	E	F	G
APLICADAS _{UIT}	14773,10	19506,06	29546,20	27225,00	60100,00	50235,06	86262,60
SI _{UIT}	12166,37	24890,16	25931,43	19555,44	53261,00	52391,55	93909,60
SII _{UIT}	3106,77	4756,75	3704,40	9562,50	9572,47	11288,00	8181,81
APLICADAS _{UIQ}	1862,00	3323,33	3724,00	5999,40	7796,00	11105,18	15859,50
SI _{UIQ}	66,70	140,00	121,72	349,95	310,25	725,40	1620,00
SII _{UIQ}	1458,12	2608,20	2673,22	3708,72	5240,43	5786,17	5921,21
$\frac{SII_{UIT}}{SII_{UIQ}}$	2,13	1,82	1,38	2,57	1,87	1,95	1,38

Tabela IV - Determinação das atividades antitriptica e anti-quimiotriptica de extratos parcialmente purificados a partir de sementes do cultivar seridô, assim como das frações SI e SII obtidas por cromatografias (A,B,C,D,E,F,G; a cromatografia D foi realizada com extrato bruto) em SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina.

BSCTH

544185

BSCT



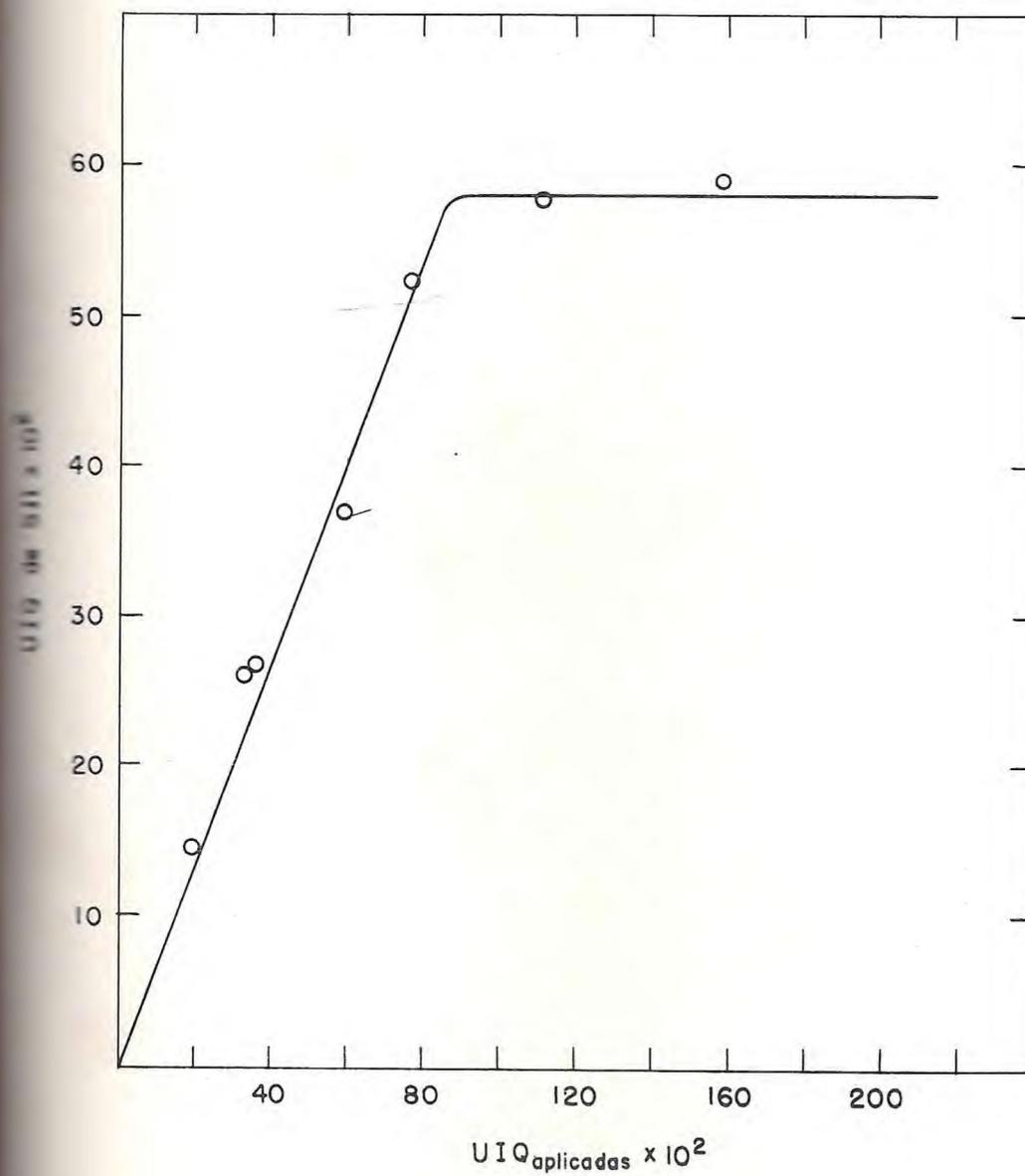


Figura 3 - Curva de saturação da coluna de SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina com inibidores da enzima.

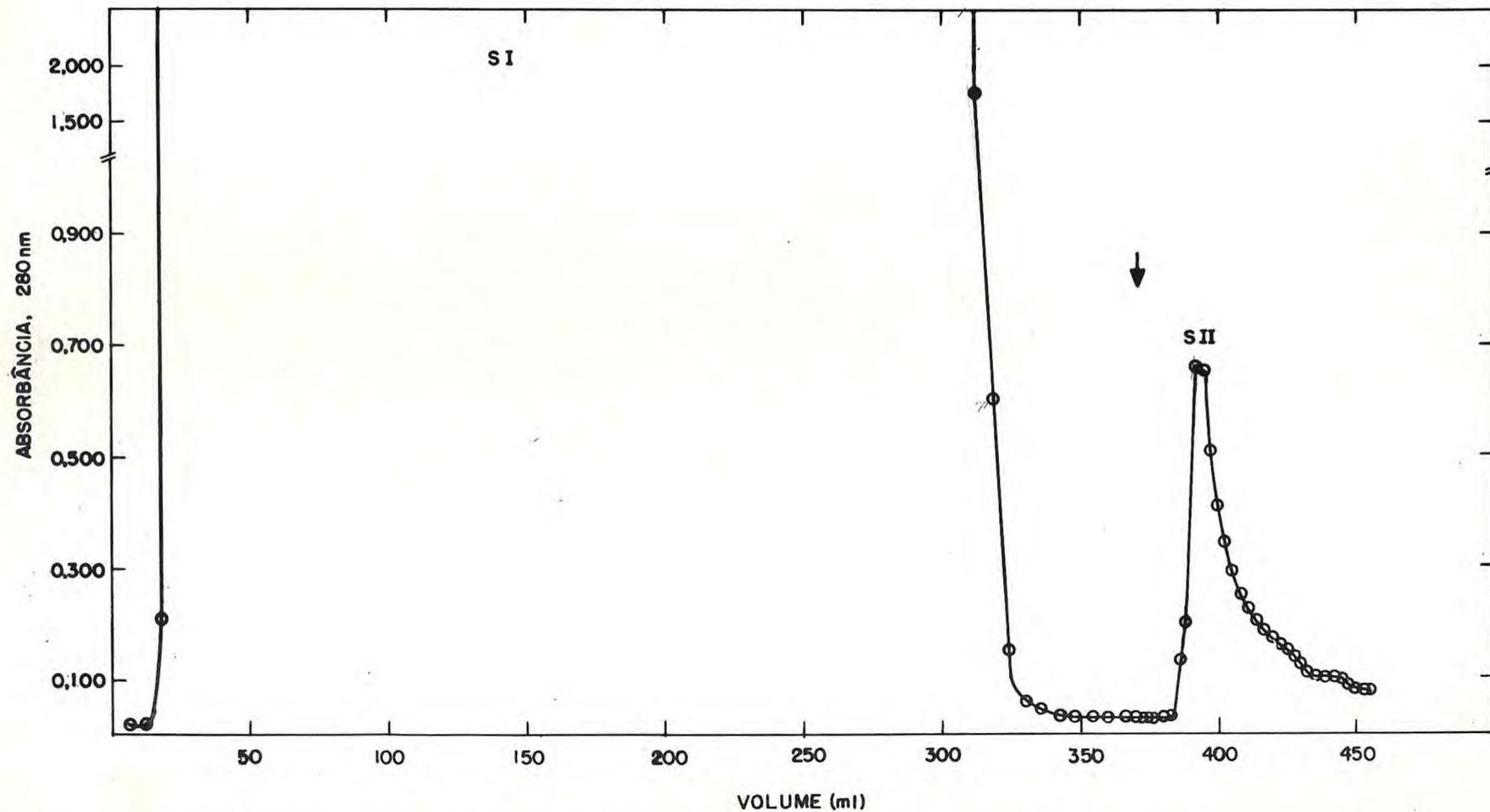


Figura 4 - Cromatografia em SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina de extrato parcialmente purificado (EBT) de sementes do cultivar seridô (solução saturante). Coluna 14,5 cm x 1,3 cm; tampão de partida: acetato de sódio 0,1 M contendo NaCl 0,3 M, pH 4.0. A seta indica o início da eluição com HCl 0,01 M contendo NaCl 0,3 M.

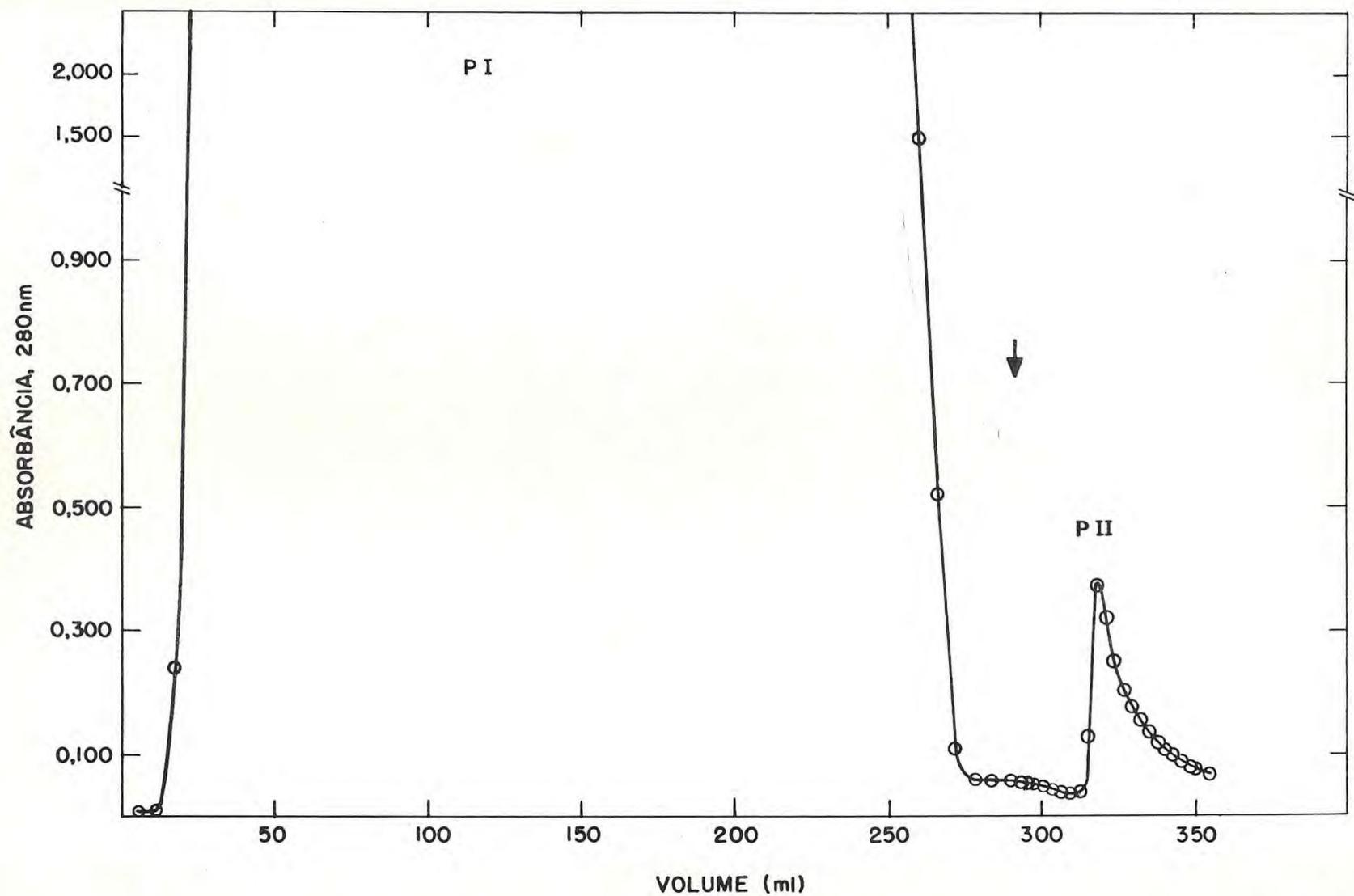


Figura 5 - Cromatografia em SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina de extrato parcialmente purificado (EBT) de sementes do cultivar pitiúba (solução saturante). Coluna 14,5 cm x 1,3 cm; tampão de partida: acetato de sódio 0,1 M contendo NaCl 0,3 M, pH 4.0. A seta indica o início da eluição com HCl 0,01 M contendo NaCl 0,3 M.

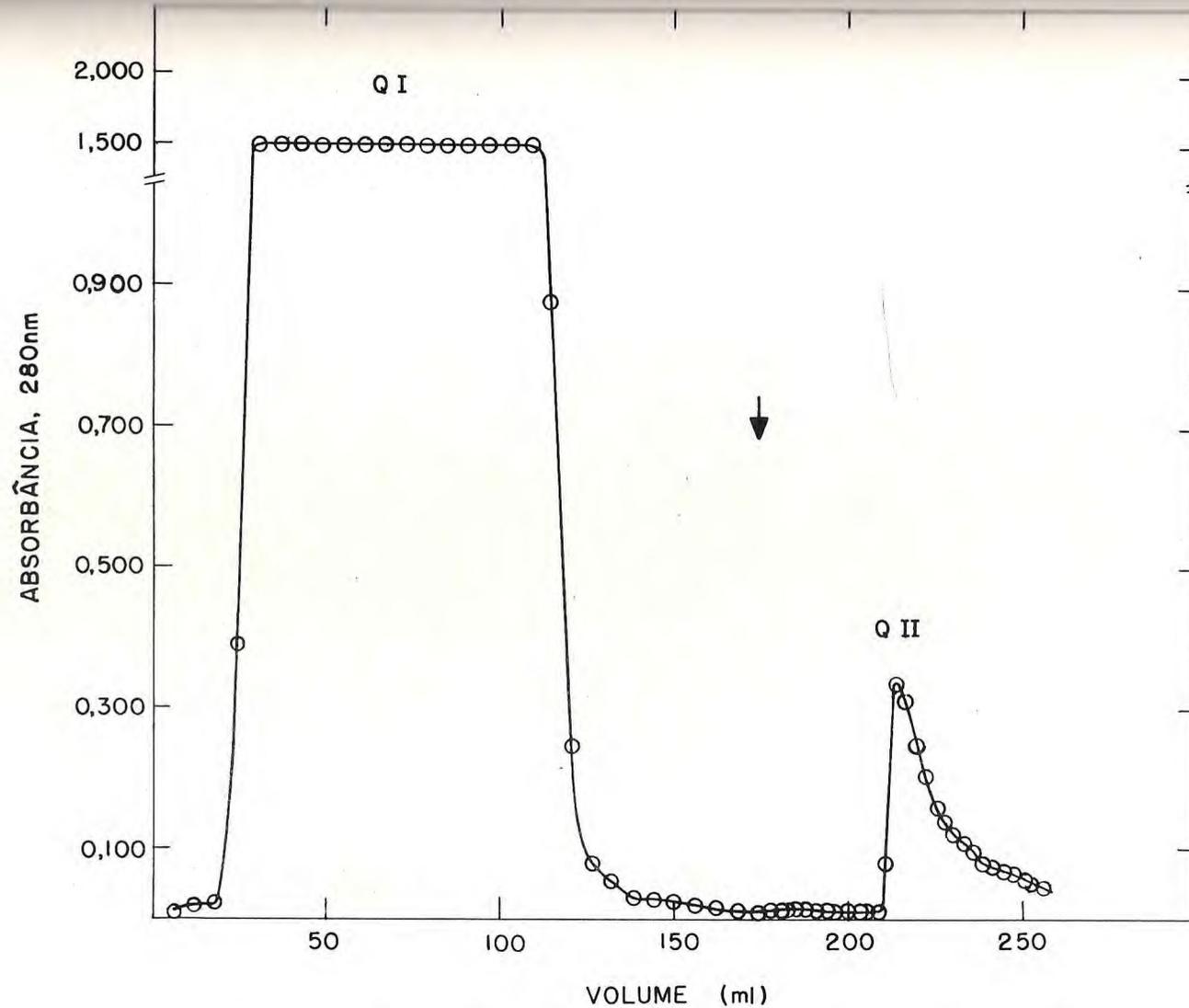


Figura 6 - Cromatografia em SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina de extrato parcialmente purificado (EBT) de sementes do cultivar quebra-cadeira (solução saturante). Coluna 14,5 cm x 1,3 cm; tampão de partida: acetato de sódio 0,1 M contendo NaCl 0,3 M, pH 4.0. A seta indica o início da eluição com HCl 0,01 M contendo NaCl 0,3 M.

4.4. Purificação em DEAE-celulose

As frações SII, PII e QII obtidas por cromatografia de afinidade foram purificadas por troca iônica em DEAE-celulose. As Figuras 7, 8 e 9 mostram, para cada uma das frações acima referidas, a presença de um único e mesmo pico com atividade contra tripsina e quimiotripsina. Este pico era eluído com uma concentração de NaCl em torno de 0,48 M. O rendimento percentual em relação à quantidade de inibidor aplicada na coluna, bem como, a denominação dada a fração em estudo de cada cultivar, estão relacionados na Tabela V. Foram obtidas cerca de 4 mg das amostras de cada cultivar isoladas por esse método, sendo as mesmas utilizadas nas análises subsequentes.

5. CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES DOS INIBIDORES

5.1. Eletroforese em gel de pH 8.1

Na Figura 10 são mostrados os resultados obtidos quando as três frações, IQSII, IQPII e IQQII foram submetidas a eletroforese em gel de pH 8.1 e os cilindros corados com negro de amido. Em todas as frações analisadas foi observada a presença de uma banda bastante nítida, assim como, de uma banda mais fraca, provavelmente uma pequena impureza de significado desprezível ($\sim 10\%$).

Os resultados obtidos quando os cilindros foram submetidos à técnica de coramento negativo para tripsina e quimiotripsina são mostrados também na Figura 10. Nas três frações analisadas foi detectada a presença de apenas uma banda de mesma mobilidade tanto nos experimentos realizados com tripsina como naqueles com quimiotripsina. Esse componente assim revelado coincidia com a banda de maior intensidade visualizada por coloração com negro de amido.

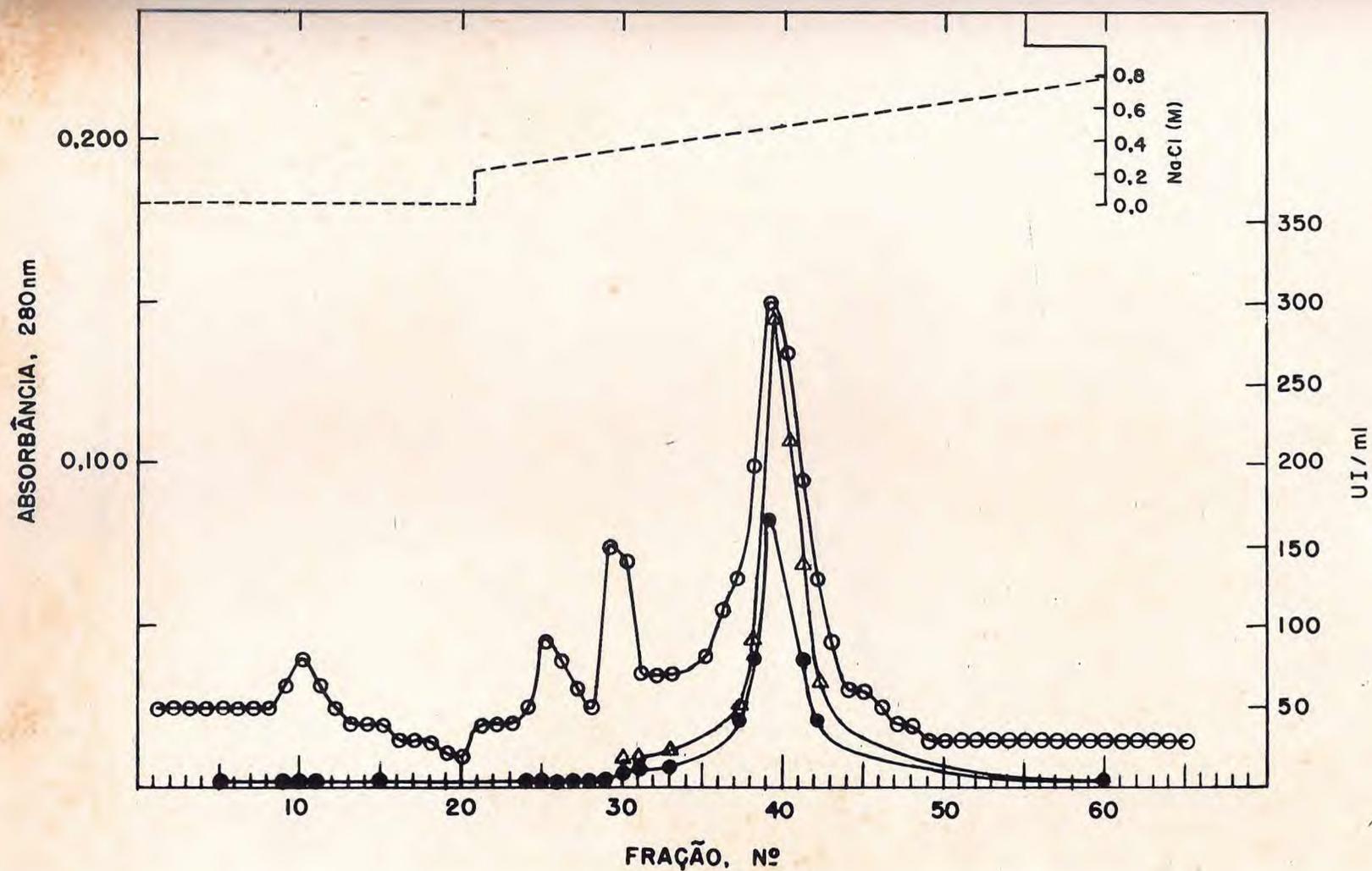


Figura 7 - Cromatografia em DEAE-celulose de SII. Coluna 12 cm x 1,3 cm; tampão de partida: fosfato 0,005 M, pH 7.0 seguido por gradiente linear de concentração salina: volume da fração: 2,5 ml; (○-○) $A_{280 \text{ nm}}$; (◁-▷) UI/ml; (●-●) UIQ/ml; (- -) concentração de NaCl.

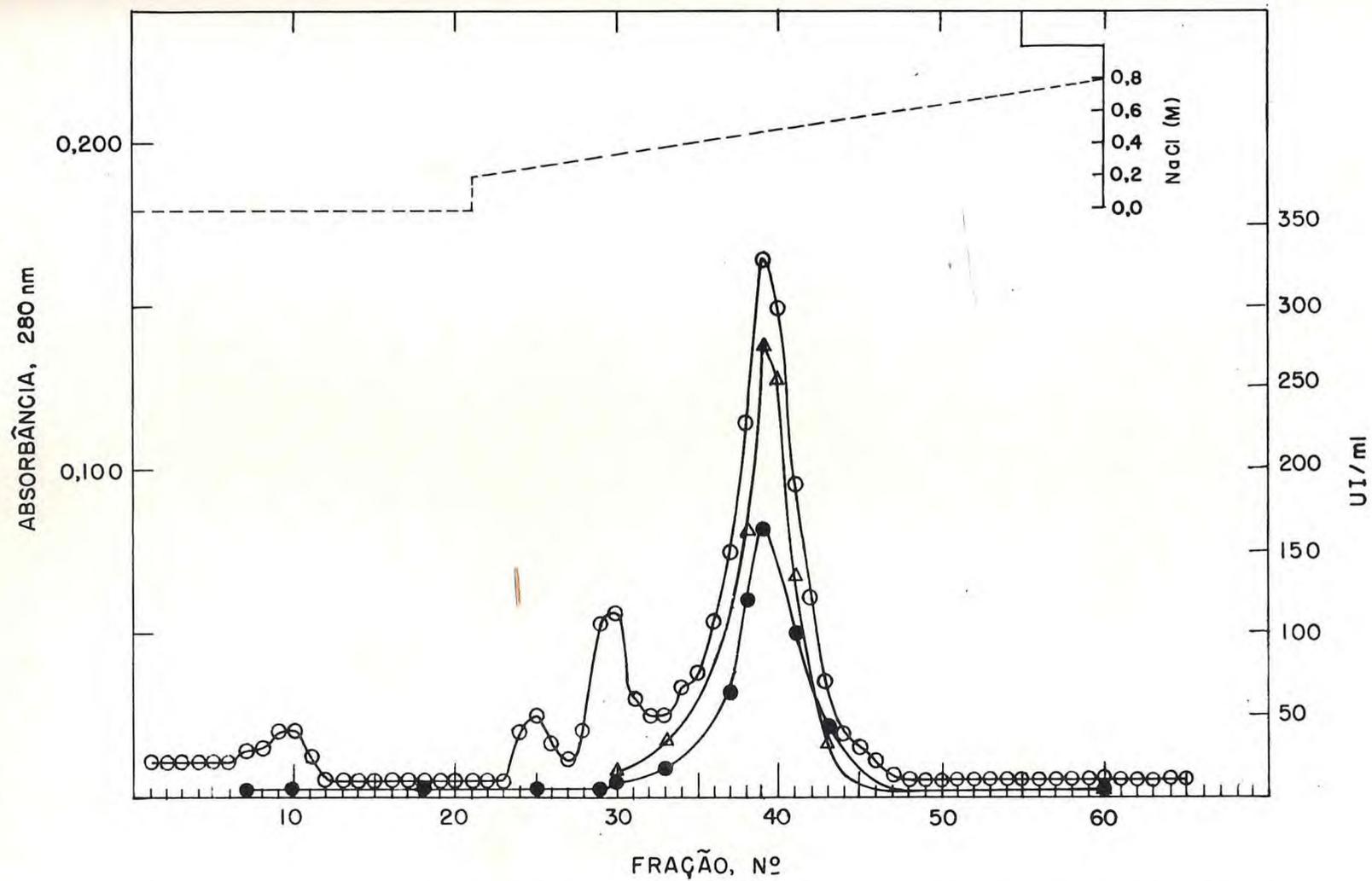


Figura 8 - Cromatografia em DEAE-celulose de PII. Coluna 12 cm x 1,3 cm; tampão de partida: fosfato 0,005 M, pH 7,0 seguido por gradiente linear de concentração salina; volume da fração: 2,5 ml; (o-o) $A_{280 \text{ nm}}$; (◁▷) UI/ml; (●-●) UIQ/ml; (- -) concentração de NaCl.

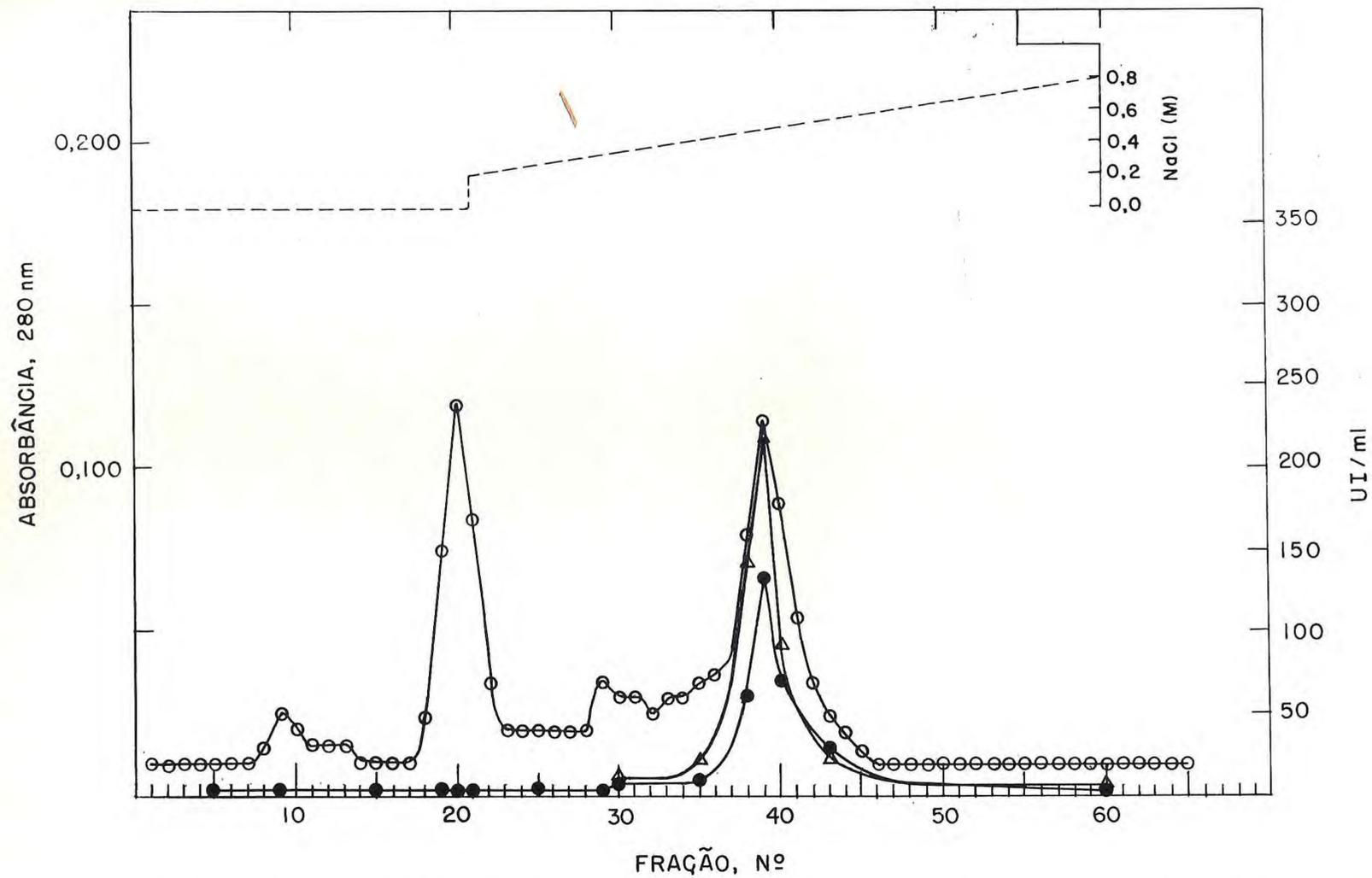


Figura 9 - Cromatografia em DEAE-celulose de Q11. Coluna 12 cm x 1,3 cm; tampão de partida: fosfato 0,005 M, pH 7.0 seguido por gradiente linear de concentração salina; volume da fração: 2,5 ml; (○) $A_{280\text{nm}}$; (△) UIT/ml; (●) UIQ/ml; (- -) concentração de NaCl.

Fração isolada por SEPHAROSE	Fração purificada em DEAE	Rendimento (%)
SII	IQSII	31,25
PII	IQPII	26,25
QII	IQQII	26,25

Tabela V - Frações obtidas por cromatografias em troca iônica a partir de amostras provenientes das cromatografias de SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina, com seus respectivos rendimentos após passagem em DEAE-celulose.

(-)

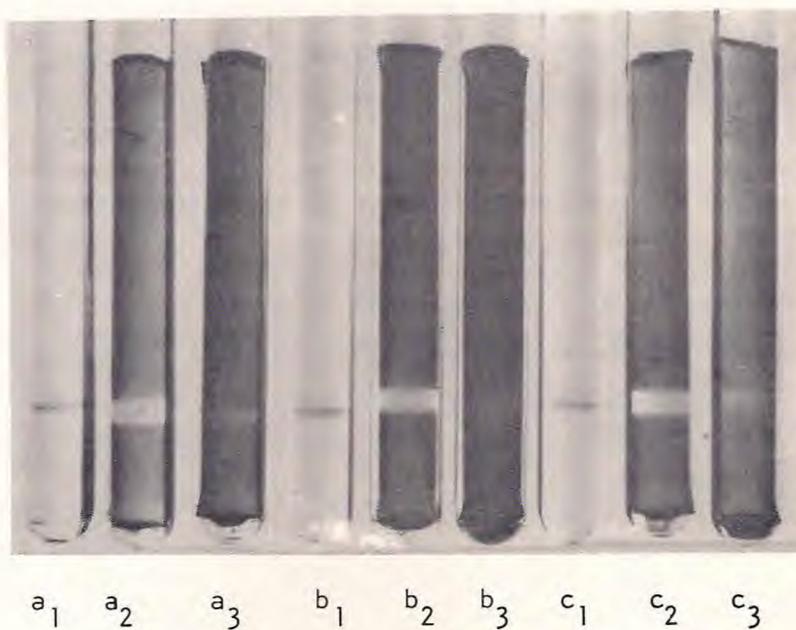


Figura 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8.1 de IQSII (a_1 , a_2 , a_3), IQPII (b_1 , b_2 , b_3) e IQQII (c_1 , c_2 , c_3). As bandas de proteína (a_1 , b_1 , c_1) foram coradas com negro de amido. Na visualização dos inibidores os geis a_2 , b_2 e c_2 , foram tratados com tripsina e os geis a_3 , b_3 e c_3 com quimio tripsina.

5.2. Eletroforese em gel com SDS

A Figura 11 e a Tabela VI mostram os resultados obtidos quando as três frações foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS 1%. Em todas as amostras analisadas, tanto para proteína como para inibidores de tripsina e quimiotripsina foi revelada a presença de um único componente, cujo peso molecular em torno de 28.000 daltons foi determinado de acordo com a curva de peso molecular estabelecida por Xavier Filho e Moreira (48).

5.3. Eletroforese em gel com SDS e β -ME

A Figura 12 e a Tabela VII mostram os resultados obtidos quando as frações tratadas com β -ME foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS. O número e a posição das bandas resultantes, variou de acordo com o cultivar em estudo. Componentes com peso molecular cerca de 22.000, 16.500 e 11.000 daltons foram encontrados numa frequência mais acentuada e com maior nitidez para os três cultivares. O último valor, provavelmente corresponde ao peso molecular mínimo de 11.000 daltons. Além desses componentes, para cada cultivar foi observada a presença de bandas em posições correspondentes a pesos moleculares mais baixos que o considerado mínimo.

Nas experiências de visualização dos inibidores de tripsina e quimiotripsina usando-se baixas concentrações de cerca de 1 μ g de inibidor por gel, não se verificou a presença de bandas. Quando se aplicou 5 μ g de cada preparação de inibidor foi encontrado um componente com atividade antitriptica em posição correspondente a peso molecular de 11.000 daltons. Por outro lado, a atividade anti-quimiotriptica, mesmo em concentrações mais elevadas, não foi detectada.

(-)

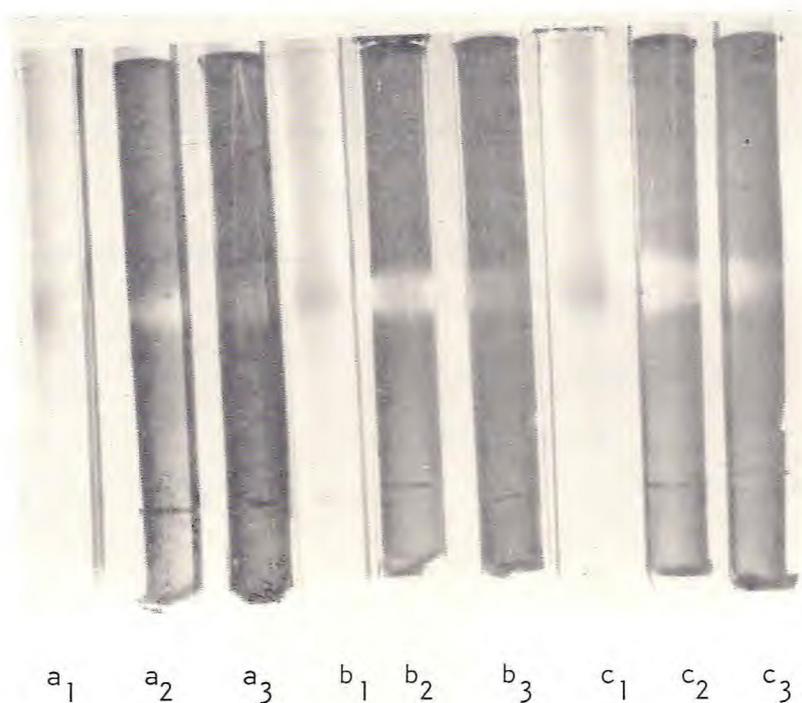


Figura 11 - Eletroforese de IQSII (a_1, a_2, a_3), IQPII (b_1, b_2, b_3) e IQQII (c_1, c_2, c_3) em gel de poliacrilamida com SDS. As bandas de proteínas (a_1, b_1, c_1) foram coradas com negro de amido. Na visualização dos inibidores os geis a_2, b_2 e c_2 foram tratados com tripsina e os geis a_3, b_3 e c_3 com quimiotripsina.

Amostras	Peso molecular ($\mu \pm \delta$)	C.V.
IQSII	27994 \pm 258	0,92
IQPII	28251 \pm 328	1,16
IQQII	28788 \pm 332	1,15

Tabela VI - Determinação do peso molecular das frações IQSII, IQPII e IQQII por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS. $\mu \pm \delta$ = média \pm desvio padrão, C.V. = coeficiente de variação. Cada valor representa 4 determinações.

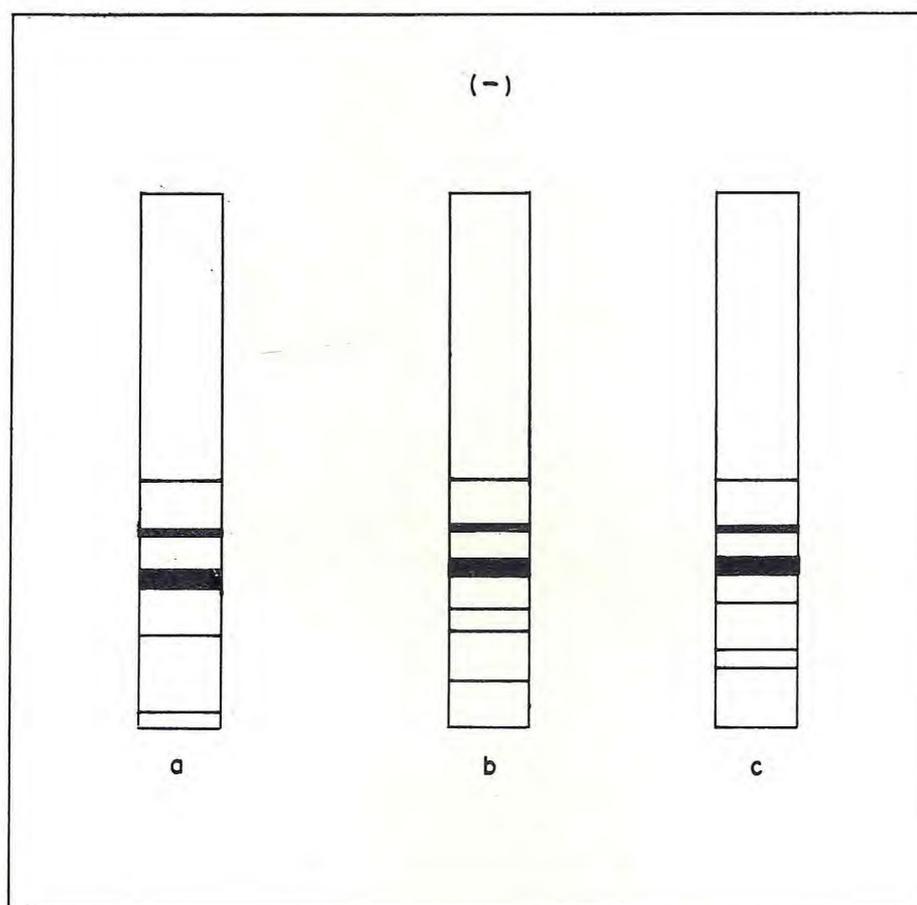


Figura 12 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β -ME. Amostras: a) IQSII; b) IQPII; c) IQQII.

AMOSTRA	Nº DE BANDAS	PESO MOLECULAR
IQSII	5	21937; 16503; 11071; 3317; 454
IQPII	6	21937; 16755; 11514; 5925; 3501; 779
IQQII	6	21406; 15996; 11519; 5925; 2618; 1101

Tabela VII - Determinação do peso molecular das bandas detectadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β -ME das amostras IQSII, IQPII e IQQII.

5.4. Espectro de absorção

Para determinação do espectro de absorção das frações IQSII, IQPII e IQQII, foram preparadas soluções em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.6 contendo respectivamente 1,185, 0,5 e 0,5 mg/ml. Os gráficos correspondentes encontram-se nas Figuras 13, 14 e 15. As três frações estudadas apresentaram espectros de absorção semelhantes na região do ultravioleta. O cálculo do coeficiente de extinção ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$), apresentou os seguintes valores para os três cultivares: seridô 7,52; pitiúba 4,00 e quebra-cadeira 4,95.

5.5. Focalização isoeletrica

As três frações, IQSII, IQPII e IQQII mostraram-se heterogêneas quando submetidas a focalização isoeletrica em placas de gel de poliacrilamida. Quando as placas foram tratadas pelo método de coramento negativo de Uriel e Berges (45), usando quer tripsina quer quimiotripsina foi observada a presença de três bandas conforme mostram as Figuras 16 e 17. Em todas as amostras estudadas foram determinados os valores de 4,72, 4,56 e 4,52 como pontos isoeletricos das bandas observadas. Quando se utilizou precipitação com TCA 15% e coloração com "Coomassie Blue" foi revelada uma banda bem nítida e outra difusa; a primeira correspondendo ao inibidor de menor acidez detectado quando se utilizou o processo de coramento negativo. Esta banda parece constituir cerca de 90% do total da proteína aplicada. A banda difusa provavelmente corresponderia às outras duas bandas que aparecem no experimento para caracterização de inibidores.

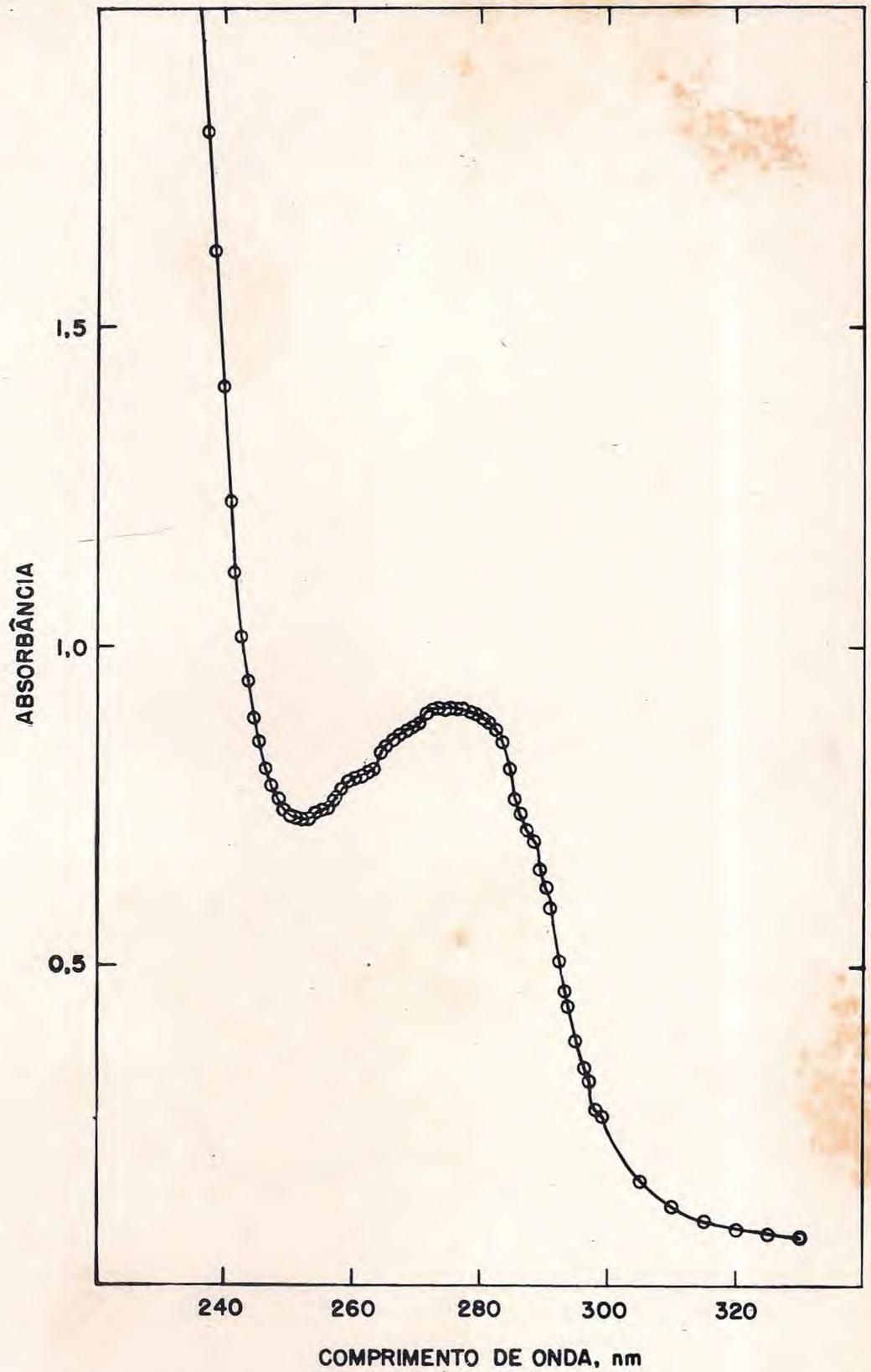


Figura 13 - Espectro de absorção de IQSII (1,185 mg/ml em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.6) na região do ultravioleta.

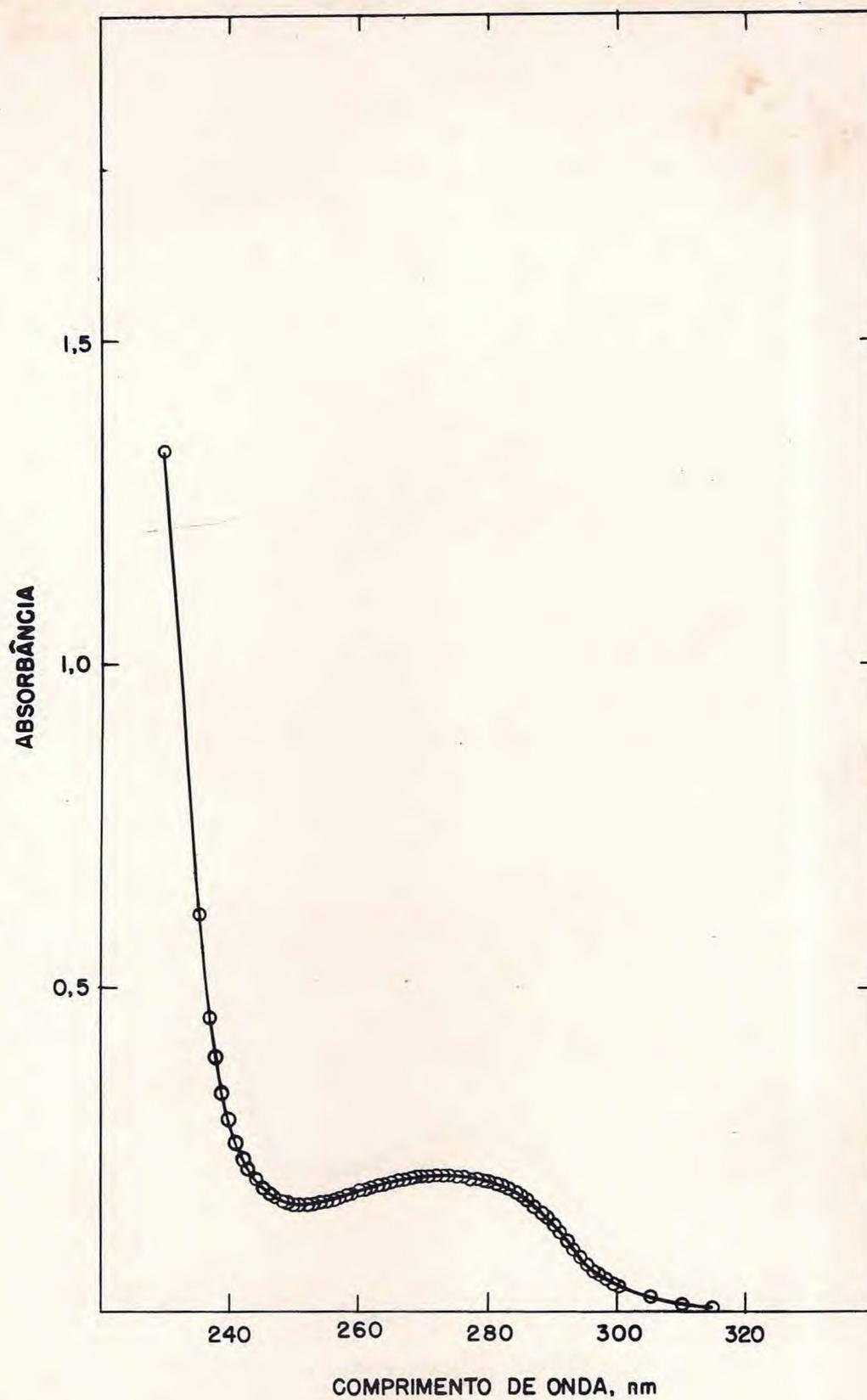


Figura 14 - Espectro de absorção de IQP11 (0,5 mg/ml em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.6) na região do ultravioleta.

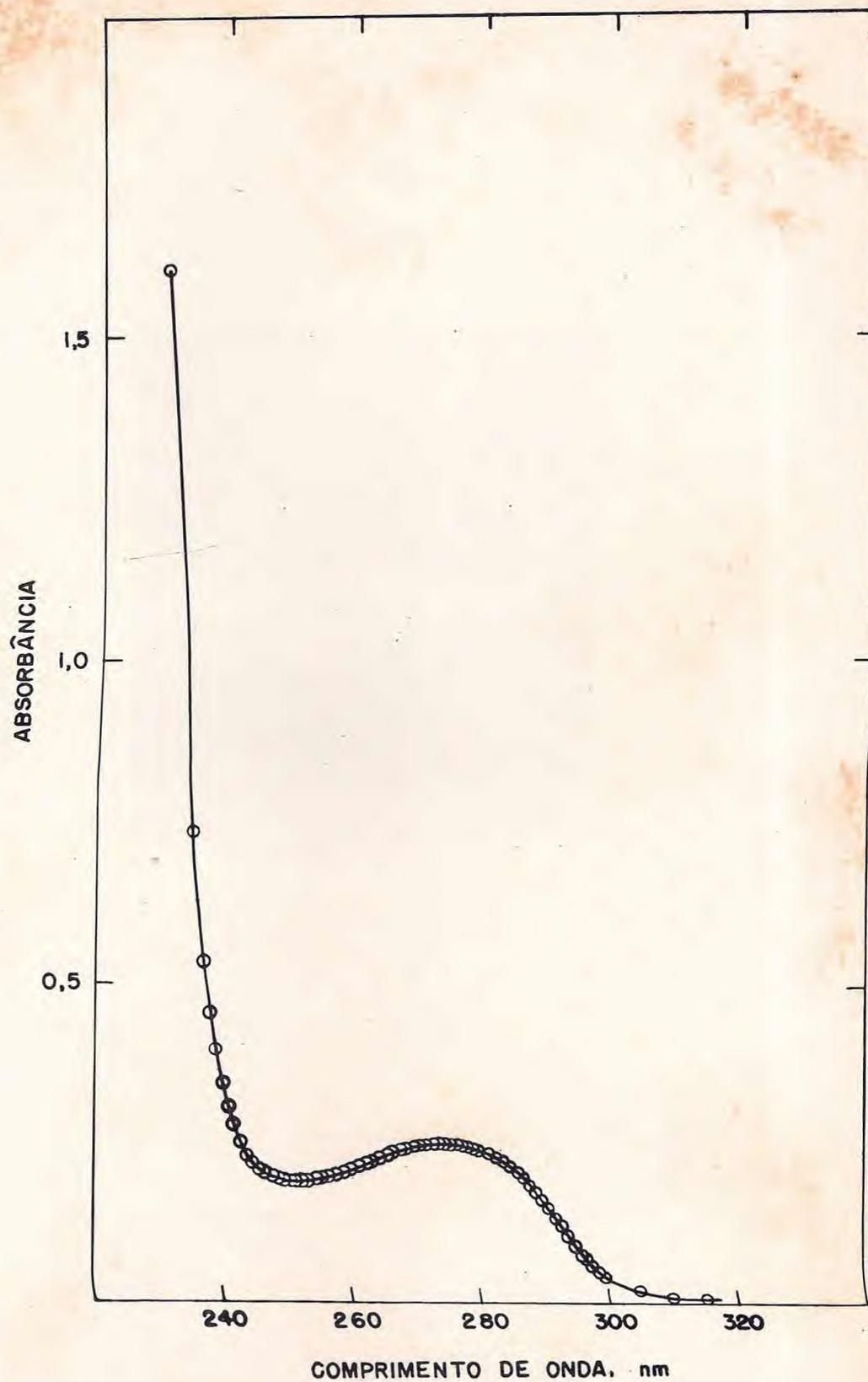
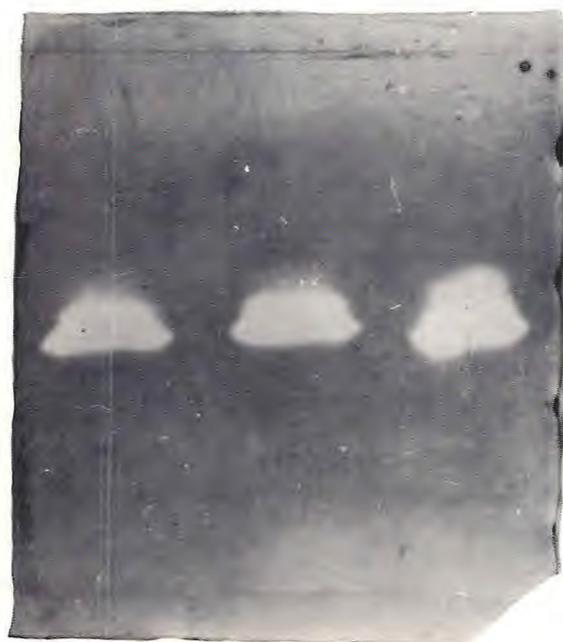


Figura 15 - Espectro de absorção de IQ11 (0,5 mg/ml em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.6) na região do ultravioleta.

(-)



a

b

c

Figura 16 - Focalização isoelétrica em placas de gel de poliacrilamida. Os inibidores foram revelados com tripsina. Amostras: a) IQQII; b) IQPII; c) IQSII.



a

b

c

Figura 17 - Focalização isoelétrica em placas de gel de poliacrilamida. Os inibidores foram revelados com quimiotripsina. Amostras: a) IQQII; b) IQPII; c) IQSII.

IV. DISCUSSÃO

Diferenças quantitativas no conteúdo de inibidores de tripsina e quimiotripsina foram encontradas entre os cultivares seridô, pitiúba e quebra-cadeira. Isto foi mais marcante no que diz respeito ao cultivar quebra-cadeira que apresentou uma concentração de inibidores cerca de 2 a 3 vezes superior aos outros dois cultivares; nos cultivares seridô e pitiúba a concentração dessas substâncias foi comparável. Sohnie e Bhandarkar (51) encontraram diferenças significativas na concentração de inibidores de duas variedades de *Vigna catjung*, enquanto quatro variedades de *Phaseolus vulgaris* continham concentrações aproximadas desses inibidores. Diferenças significativas na concentração dos inibidores de tripsina também foram obtidas a partir de análises feitas em 115 cultivares de *Vicia faba* (52).

Variações genéticas e ambientais são fatores importantes que influem no conteúdo de inibidores. Órgãos de plantas distintas de um mesmo táxon podem apresentar diversificação na concentração e características de suas proteínas (2). Dados obtidos a partir de programas de pesquisas realizados pelo Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará com *Vigna sinensis*, mostram que os cultivares seridô, pitiúba e quebra-cadeira apresentam tanto semelhanças quanto distinções em relação a caracteres morfológicos e agrônômicos (35,37). Dessa maneira, os três cultivares possuem crescimento indeterminado da haste com folha de coloração verde, semelhança no número de flores por inflorescência, produção biológica (peso das plantas em grama) e produção de sementes. Por outro lado enquanto o fruto de seridô e quebra-cadeira tem cor rosada, o de pitiúba possui uma tonalidade marrom. Os cultivares seridô e pitiúba são altamente suscetíveis à doença do mosaico, cujo agente etiológico é o vírus do mosaico de

Vigna, e no entanto o cultivar quebra-cadeira é moderadamente resistente (35).

Quando extratos brutos das três sementes foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8.1, um mesmo padrão eletroforético foi obtido, sendo detectados para cada cultivar quatro inibidores de tripsina e somente um inibidor de quimiotripsina. Esses resultados estão de acordo com a multiplicidade de inibidores geralmente observada em outras fontes vegetais (11,16,18). Dentro do gênero *Glicina* há pouca diferença eletroforética entre os inibidores das espécies *G. soja*, *G. gracilis* e *G. max*, existindo entretanto, variação entre os padrões protéicos dos inibidores de vários exemplos da espécie *G. wightii* (53).

O método de cromatografia de afinidade utilizado nesse trabalho para isolamento dos inibidores de quimiotripsina que também possuem atividade antitriptica identificados nos três cultivares tem sido bastante usado, apresentando diversas vantagens tais como alta seletividade, bom rendimento e rapidez na obtenção de dados (29,40). Genis e Cantor isolaram em estado homogêneo um inibidor de quimiotripsina que também inibe tripsina (BEPCI) utilizando SEPHAROSE-Tripsina e SEPHAROSE-Quimiotripsina, a partir de sementes de *Vigna sinensis*, variedade "Redbow" (29). Outros autores que fizeram uso desse tipo de cromatografia têm entretanto relatado perda de atividade inibitória do produto cromatográfico em relação ao extrato aplicado. Essa perda de atividade seria causada por um processo de inativação que ocorre nos inibidores devido a uma interação específica com a enzima (54). Durante essa interação o sítio reativo do inibidor sofreria uma clivagem dando origem a formas modificadas que podem interferir em etapas posteriores de purificação (55). Durante o desenvolvimento deste trabalho além de ter sido constatada perda de 28% da atividade anti-quimiotriptica nas frações SII, PII e QII obtidas de cromatografias em SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina em rela-

ção aos extratos parcialmente purificados de cada cultivar, outros resultados discutidos a seguir podem ser atribuídos a clivagem referida acima.

Quando as frações isoladas por SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina foram posteriormente purificadas em cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose a molaridade de NaCl necessária ao deslocamento dos três inibidores, agora denominados IQSII, IQPII e IQQII, foi a mesma, indicando uma provável semelhança entre os três inibidores. Estes, quando submetidos a eletroforese em gel de poli(acrilamida) a pH 8.1 e eletroforese em gel de poli(acrilamida) com SDS mostraram-se homogêneos tanto quando tratados com negro de amido como no coramento negativo para inibidores de tripsina e quimiotripsina. O mesmo peso molecular de 28.000 daltons, calculado para os três inibidores por eletroforese em SDS, é diferente daquele encontrado (24.000 daltons) para o inibidor de quimiotripsina/tripsina (VSTI/CI) por Xavier Filho e Moreira (48). Esse peso molecular é devido certamente a existência de um sistema associante nessas proteínas, porém uma associação diferente da existente em VSTI/CI, modificada provavelmente pela presença de novas espécies originadas na coluna de quimiotripsina. Além disso, essas moléculas, criadas pela cromatografia de afinidade, podem ligar-se às moléculas originais de modo que os complexos resultantes apresentem conformações incomuns que, mantidas em SDS apresentariam uma relação detergente/proteína menor do que a normal e conseqüentemente teriam velocidades de migração menores. Esta explicação estaria de acordo com a observação de diversos exemplos de anomalias na ligação de SDS com proteínas, principalmente quando em estado nativo (56).

Os inibidores, após desnaturação por β -ME em presença de SDS, mostraram-se heterogêneos por eletroforese em gel de poli(acrilamida) com SDS e coloração com negro de amido. Apesar de que os três inibidores tenham apresentado as mesmas

bandas de 22.000, 16.500 e 11.000 daltons foram observadas variações em relação às outras bandas reveladas em posições correspondentes a pesos moleculares mais baixos que 11.000 dai-tons. Esses componentes menores, certamente, tiveram origem durante a passagem dos inibidores na coluna de SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina não são por clivagem nos seus centros ativos conforme mencionado anteriormente, como também, por quebra de ligações em outros locais das moléculas. O peso molecular mínimo de 11.000 daltons que confirma resultados anteriores (48) e a presença de uma banda na posição correspondente a 22.000 daltons indicam um efeito de associação do tipo monô-mero \rightleftharpoons dímero que está de acordo com resultados típicos obti-dos para inibidores de diversas fontes vegetais (11,12,13). O componente encontrado na posição correspondente a 16.500 dal-tons poderia ser formado pelo monômero associado a pequenas moléculas originadas pela SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina. Consi-derando-se a modificação ocasionada pela coluna de SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina e os diferentes padrões eletroforéticos en-contrados para IQSII, IQPII e IQQII após redução por β -ME, infere-se que eles possuem estruturas primárias ligeiramente diferentes. No entanto entre os vários componentes menores en-contrados para os três cultivares, aquele em posição corres-pondente a peso molecular de cerca de 6.000 daltons foi comum aos inibidores isolados de pitiúba e quebra-cadeira. Isso in-dica que essa distinção na sequência de aminoácidos é menos pronunciada entre os inibidores IQPII e IQQII. Essa última afirmação é reforçada ao constatarmos que apesar dos três inividores possuem espectros de absorção semelhantes na região do ultravioleta os valores encontrados para os coeficientes de extinção são mais próximos para IQPII e IQQII.

Os três inibidores estudados são provavelmente do tipo "double-headed", característica essa comum à maioria dos inibidores de quimiotripsina que também inibem tripsina (13). Isso foi sugerido no presente trabalho pelo fato de que a ati

vidade antitriptica mostrou maior resistênciã a reduçãõ por β -ME que a atividade antiquimiotriptica.

Três bandas apresentando atividade antiquimiotriptica e antitriptica foram reveladas para cada um dos três inibidores utilizando-se focalizaçãõ isoelétrica em gel de poliacrilamida. Cada componente quando comparado entre os três inibidores possui o mesmo ponto isoelétrico, diferindo no entanto por pequenas variações. Os componentes de pI, igual a 4,72, correspondem aos inibidores de quimiotripsina, objetos de interesse desse trabalho, desde que apõs focalizaçãõ isoelétrica e revelaçãõ em TCA 15% com coloraçãõ em "Coomassie Blue" eles aparecem numa proporçãõ de cêrca de 90% em relaçãõ aos demais. A presençã dos outros dois componentes mais ácidos (pI = 4,56 e 4,52) pode ser explicada pela existênciã de outros inibidores de quimiotripsina nos extratos brutos alê m do ûnico normalmente encontrado. Esses outros inibidores de quimiotripsina poderiam encontrar-se em concentrações muito baixas sendo difícil detectá-los, sõ aparecendo depois das experiênciãs de cromatografia de afinidade quando as concentrações dos inibidores mais ácidos provavelmente aumentaram com relaçãõ a concentraçãõ do inibidor de pI 4,72. Isto talvez aconteça devido a maior destruiçãõ da atividade antiquimiotriptica desse inibidor ao passar pela coluna de SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina. As relações de concentraçãõ foram aumentadas de tal forma que ao usar-se uma têcnica tãõ apurada como a focalizaçãõ isoelétrica em placas de gel de poliacrilamida ao lado do coramento negativo de Uriel e Berges esses inibidores poderam ser revelados. Uma segunda explicaçãõ fortemente apoiada pelos resultados encontrados por eletroforese com SDS e β -ME é que a molêcula original do inibidor de quimiotripsina na sua passagem pela coluna de SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina sofreu hidrõlise em mais de um local com perda de determinados resídus de aminoácidos dando origem a outros inibidores de maior acidez.

V. CONCLUSÕES

- 1) Foram detectadas diferenças significativas nas quantidades de inibidores de tripsina e quimiotripsina existentes nos três cultivares de *Vigna sinensis* (L.) Savi estudados;
- 2) O mesmo padrão eletroforético (gel de poliacrilamida, pH 8.1 e em presença de SDS) para inibidores de tripsina e quimiotripsina foi constatado para os três cultivares;
- 3) Foi constatada perda de atividade inibitória contra quimio tripsina, quando do processo de isolamento por meio de SEPHAROSE 4B-Quimiotripsina;
- 4) Os inibidores de quimiotripsina, isolados e purificados, apresentaram o mesmo peso molecular mínimo, cerca de 11.000 daltons;
- 5) Os inibidores apresentaram o mesmo tipo de associação em SDS;
- 6) Os três inibidores isolados dos cultivares seridó, pitiúba e quebra-cadeira, provavelmente diferem em sua composição de aminoácidos aromáticos;
- 7) Apesar de apresentarem várias propriedades em comum (ponto isoelétrico, peso molecular, associação em SDS), os inibidores foram considerados formas distintas, tendo IQP11 provavelmente uma estrutura primária mais próxima da de IQ11 do que de IQS11.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. DAYHOFF, M. O. and ECK, R. V. 1972. Tracing biochemical evolution. In: Atlas of Protein Sequence and Structure (Dayhoff, M. O., ed.), vol. 5, pp. 1-5, National Biomedical Research Foundation, Washington.
2. BOULTER, D. and DERBYSHIRE, E. 1971. Taxonomics aspects of the structure of legume proteins. In: Chemotaxonomy of the Leguminosae (Harbone, J. B., Boulter, D. and Turner, B. L., eds.), pp. 309-365, Academic Press, London.
3. LEHNINGER, A. L. 1970. Biochemistry, 2rd ed., Worth Publishers, Inc., New York.
4. FOX, D. J. 1964. Doctoral Thesis, Liverpool, citado em 2.
5. McLAUGHLIN, P. J. and DAYHOFF, M. O. 1972. Evolution of species and proteins: a time scale. In: Atlas of Protein Sequence and Structure (Dayhoff, M. O., ed.), vol. 5, pp. 47-52, National Biomedical Research Foundation, Washington.
6. CHIRPICH, T. P. 1975. Rates of protein evolution: a function of amino acid composition. Science, 188, 1022-1023.
7. FOX, D. J., THURMAN, D. A. and BOULTER, D. 1964. Phytochemistry, 3, 417, citado em 2.
8. BOULTER, D., THURMAN, D. A. and DERBYSHIRE, E. 1967. A disc electrophoretic study of globulin proteins of legume seeds with reference to their systematics. New Phytol., 66, 27-36.
9. BOULTER, D., DERBYSHIRE, E., FRAHM-LELIVELD, J. A. and POLHILL, R. M. 1970. Observations on the cytology and seed-proteins of various african species of Crotalaria L. (Leguminosae). New Phytol., 69, 117-131.

10. LASKOWSKI, M. and LASKOWSKI, M. Jr. 1954. Naturally occurring trypsin inhibitors. In: Adv. Pro.. Chem. (C. Anfinsen, M. Anson, K. Barley and J. Edsall, eds.), vol. 9, pp. 203-242, Academic Press, New York.
11. VOGEL, R., TRAUTSCHOLD, I. and WERLE, E. 1968. Natural Proteinase Inhibitors. Academic Press, New York.
12. RYAN, C. A. 1973. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. Ann. Rev. Plant. Physiol., 24, 173-196.
13. RICHARDSON, M. 1977. The proteinase inhibitors of plants and micro-organisms. Phytochemistry, 16, 159-169.
14. LIENER, I. F. and KAKADE, M. L. 1969. Protease inhibitors. In: Toxic Constituents of Plant Foodstuffs (I.E. Liener, ed.), pp. 7-68, Academic Press, New York.
15. PUSZTAI, A. 1967. Trypsin inhibitors of plant origin, their chemistry and potential role in animal nutrition. Nutr. Abstr. Rev., 37, 1-9.
16. XAVIER FILHO, J. 1973. Trypsin inhibitors during germination of Vigna sinensis seeds. Physiol. Plant., 28, 149-154.
17. MEANS, G. E., RYAN, D. S. and FEENEY, R. E. 1974. Protein inhibitors of proteolytic enzymes. Acc. Chem. Res., 7, 315-320.
18. LASKOWSKI, M. Jr. and SEALOCK, R. W. 1971. Protein proteinase inhibitors - molecular aspects. In: The Enzymes (Boyer, P. D., ed.), 3rd ed., vol. 3, pp. 375-473, Academic Press, New York.
19. ROYER, A. 1975. Inhibiteurs d'enzymes protéolytiques et protéases des graines. In: Les Protéines des Graines (J. Miège, ed.), pp. 159-201, Genève.
20. BANERJI, A. P. and SOHONIE, K. 1969. Trypsin inhibitor from field beans (Dolichos lablab). Isolation, purifi-

- cation and properties of a trypsin inhibitor from field beans. *Enzymologia*, 36, 137-152.
21. KASSELL, B. 1970. Trypsin inhibitors from other legumes. In: *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. eds.), vol. 19, pp. 862-871, Academic Press, New York.
 22. VENTURA, M. M. and XAVIER FILHO, J. 1966. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vigna sinensis*). I. Purification and partial characterization. *Ann. Acad. Brasil. Sci.*, 38, 553-566.
 23. WILSON, K. A. and LASKOWSKI, M. Jr. 1973. Isolation of three iso-inhibitors of trypsin from garden bean, *Phaseolus vulgaris*, having either lysine or arginine at the reactive site. *J. Biol. Chem.*, 248(3), 756-762.
 24. BIRK, Y. 1968. Chemistry and nutritional significance of proteinase inhibitors from plant sources. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 146(2), 388-399.
 25. DECHARY, J. M. 1970. Seed proteases and protease inhibitors, *Econ. Bot.*, 24(2), 113-122.
 26. LASKOWSKI, M. Jr., KATO, I., LEARY, T. R., SCHRODE, J. and SEALOCK, R. W. 1974. Evolution of specificity of protein proteinase inhibitors. In: *Bayer-Symposium V, Proteinase Inhibitors* (Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L. J. and Truschei, E., eds.), pp. 597-611, Springer-Verlag, Berlin.
 27. CREIGHTON, T. E. 1975. Homology of protein structures: proteinase inhibitors. *Nature*, 255(5511), 743-745.
 28. SMIRNOFF, P., KHALEF, S., BIRK, Y. and APPLEBAUM, S. W. 1976. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from chick peas. (*Cicer arietinum*). *Biochem. J.*, 157, 745-751.
 29. GENNIS, L. S. and CANTOR, C. R. 1976. Double-headed pro-

- tease inhibitors from black-eyed peas. I. Purification of two new protease inhibitors and the endogenous protease by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.*, 251 (3), 734-740.
30. LIENER, I. E. 1962. Toxic factors in edible legumes and their elimination. *American J. of clinical Nutr.*, 11, 281-298.
31. SHAIN, Y. and MAYER, A. M. 1965. Proteolytic enzymes and endogenous trypsin inhibitor in germinating lettuce seeds. *Physiol. Plant.*, 18, 853-859.
32. KIRSE, M. and MIKOLA, J. 1971. Occurrence of proteolytic inhibitors in various tissues of barley. *Planta*, 96, 281-291.
33. GREEN, T. R. and RYAN, C. A. 1972. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science*, 175, 776-777.
34. MOSOLOV, V. V., LOGINOVA, M. D., FEDURKINA, N. V. and BENKEN, I. I. 1976. The biological significance of proteinase inhibitors in plants. *Plant Sci. Letters*, 7, 77-80.
35. ARAÚJO, J. P. P. e PAIVA, J. B. 1974. Caracterização de cultivares de feijão de corda, Vigna sinensis L (Savi). Em: Relatório de Pesquisa do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, pg. 1-25.
36. PAIVA, J. B., BARRETO, P. D. e SOBRAL, C. A. M. 1975. Introdução de cultivares de feijão de corda, Vigna sinensis L (Savi). Em: Relatório de Pesquisa do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, pg. 1-21.
37. PAIVA, J. B. e TEÓFILO, E. M. 1976. Introdução, caracterização, multiplicação e manutenção de germoplasma. Em:

Relatório de Pesquisa do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, pg. 1-9.

38. GOA, J. 1953. A microbiuret method for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Lab. Invest.*, 5, 218-222.
39. KUNITZ, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *J. Gen. Physiol.*, 30, 291-310.
40. CECHOVÁ, D. 1974. Isolation of isoinhibitors from cow colostrum by affinity chromatography on column of trypsin-sepharose 4B. *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, 39, 647-652.
41. XAVIER FILHO, J. 1969. Ação do calor sobre o inibidor trípico de soja no estado sólido. Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
42. LOWRY, O. H. ROSEBROUGH, M. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
43. XAVIER FILHO, J. 1974. Trypsin inhibitors in sorghum grain. *J. Food Sci.*, 39, 422-423.
44. CLARKE, J. T. 1964. Simplified "disc" (polyacrilamide gel) electrophoresis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 428-436.
45. URIEL, J. and BERGES, J. 1968. Characterization of natural inhibitors of trypsin and chymotrypsin by electrophoresis in acrylamide-agarose gels. *Nature*, 218, 578-580.
46. KAISER, K. P. and BELITZ, H. D. 1971. Proteinaseinhibitoren in lebensmitteln. Vorkommen und isolierung von trypsin und chymotrypsininhibitoren in kartoffeln. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, 1, 1-7.
47. WEBER, K. and OSBORN, M. 1964. The reability of molecular

- weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 244, 4406-4412.
48. XAVIER FILHO, J. and MOREIRA, R. A. 1978. Visualization of proteinase inhibitors in SDS-polyacrylamide gels. Anal. Biochem., 84, 296-303.
49. AWDEH, Z. L., WILLIAMSON, A. R. and ASKONAS, B. A. 1968. Isoelectric focusing polyacrylamide gel and its application to immuno globulins. Nature, 219, 66-67.
50. XAVIER FILHO, J. and SOUZA, F. D. N. Isolation and characterization of a trypsin inhibitor from Vigna sinensis seeds. Biologia Plantarum (Praga), aceito para publicação.
51. SOHONIE, K. and BHANDARKAR, A. P. 1955. Trypsin inhibitors in indian foodstuffs: part II - inhibitors in pulses. J. Sci. Industr. Res., 14C, 100-104.
52. BHATTY, R. S. 1974. Can. J. Plant. Sci., 54, 413, citado em 13.
53. MIES, D. W. and HYMOWITZ, T. 1973. Comparative electrophoretic studies of trypsin inhibitors in seed of the genus glycine. Bot. Gaz., 134(2), 121-125.
54. BELEW, M., PORATH, J. and SUNDBERG, L. 1975. The trypsin and chymotrypsin inhibitors in chick peas (Cicer arietinum L.). Purification and properties of the inhibitors. Eur. J. Biochem., 60, 247-258.
55. HOCHSTRASSER, K. and WERLE, E. 1969. Z. Physiol. Chem., 350, 249, citado em 13.
56. WAEHNELDT, T. V. 1975. Sodium dodecyl sulfate in protein chemistry. Biosystems, 6, 176-187.

VII. COMUNICAÇÕES A CONGRESSOS

31 - G.1.12. CARACTERIZAÇÃO DE INIBIDORES DE QUIMIOTRIPSINA EM TRÊS CULTIVARES DE *Vigna sinensis*. Maria Ary Ruschel e José Xavier Filho (Univ. Fed. do Ceará).

Um inibidor de quimiVigna sinensis cv. "seridô" foi anteriormente isolado e parcialmente caracterizado neste laboratório (Ventura et al, An.Acad.Brasil.Ciênc.43,238-242(1971). No trabalho citado o cultivar "seridô" foi tido erroneamente como sendo do tipo "black eyed pea". Utilizando os cultivares "seridô", "pitiuba", e "quebra-cadeira" (este fenotipicamente um "black eyed pea") isolamos, por cromatografia de afinidade em Sepharose-QuimiV.sinensis tem as mesmas propriedades. (UFC, CAPES, CNPq).

Sociedade Brasileira Para o Progresso da Ciência - 30ª Reunião Anual.

038 A CHYMOTRYPSIN/TRYPsin INHIBITOR FROM
THREE DIFFERENT *Vigna sinensis* CULTIVARS.
J.Xavier-Filho and M.A.Ruschel
Univ.Federal do Ceará, Dept.Bioquímica e

Biol.Molecular, C.Postal, 1065-60000 Fortaleza, Brazil.

A chymotrypsin/trypsin inhibitor from *Vigna sinensis* cv.seridô was isolated and partially characterized in this laboratory before (Ventura et al. An. Acad.Brasil.Ciênc.43,233,1971). The seridô bean used was then erroneously taken as being a black-eyed pea type cultivar. We report here the isolation and purification of this inhibitor from three different *V.sinensis* cultivars, one of them being a black-eyed pea type. The inhibitors were isolated by affinity-chromatography in a Sepharose 4B-chymotrypsin column and purified by DEAE-Celulose chromatography. The three inhibitors had the same associated molecular weight in PAGE-SDS (Xavier-Filho and Moreira, Anal.Biochem.84,296,1978), the same pI(4.7) as shown by isoelectric focusing in polyacrylamide gel slabs, and the same minimum molecular weight of 11,000 daltons as shown by PAGE-SDS with β -mercaptoethanol. In all three inhibitors the antitryptic activity was much more resistant to reduction by β -ME than the antichymotryptic activity. The inhibitors had the same UV absorption spectra but slight different molar extinction coefficients. The other difference was in the number and positions of protein bands seen in PAGE-SDS after reduction of the proteins by β -ME. Bands were most conspicuously seen at the 11,000, 17,500 and 22,000 daltons positions; for each one of the three cultivars minor different bands were also seen at positions corresponding to smaller molecular weight species probably originated during the affinity chromatography step. The chymotrypsin/trypsin inhibitors in the three *V.sinensis* cultivars seem to have very similar amino acid compositions, differing probably by a very small number of residues.

Segundo Congresso de PAABS
Caracas-Venezuela, 1978.