

LECTINAS DE *Canavalia brasiliensis* Mart.
ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E
COMPORTAMENTO DURANTE A GERMINAÇÃO

Benildo Sousa Cavada

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

1980

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 Universidade.

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

Benildo Sousa Cavada

Dissertação aprovada por:

Renato de Azevedo Moreira
Orientador da Dissertação

data

Iracema Lima Ainouz

data

José Xavier Filho

data

A meus pais
João Baptista e Delvahir
e a meus irmãos.

Este trabalho foi realizado graças às seguintes instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) através de bolsa de Pós-Graduação (PICD) concedida ao autor e através de auxílios ao curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), 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 foi executada esta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Renato de Azevedo Moreira pela dedicação com que orientou a execução deste trabalho como pela sincera amizade demonstrada.

Aos professores José Xavier Filho e Iracema Lima Ainoz pelas sugestões apresentadas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Joaquim Marques pela determinação na análise elementar da semente estudada.

A todos os professores, colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC pela solidariedade e amizade que sempre me demonstraram.

A Universidade Federal de Pelotas pela licença de afastamento para fazer o curso de Mestrado, e aos colegas do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química e Geociências desta Universidade pela confiança em mim depositada e pelo estímulo que me proporcionaram.

Finalmente a meus pais e irmãos que, como eu, acreditam que com trabalho e perseverança podemos ser hoje melhor que ontem.

ÍNDICE GERAL

LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS	XIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XVI
I. INTRODUÇÃO	1
II. MATERIAIS E MÉTODOS	8
1. Materiais	8
2. Métodos	9
2.1. Preparação da farinha de sementes quiescentes	9
2.2. Condições de germinação	9
2.3. Análise elementar	9
2.3.1. Determinação de umidade	9
2.3.2. Determinação de nitrogênio total ..	10
2.3.3. Determinação de lipídios totais ...	10
2.3.4. Determinação de cinzas	10
2.4. Determinação de peso fresco e peso seco ..	11
2.5. Preparação de extratos	11
2.6. Determinação de proteínas	11
2.7. Determinação de atividade hemaglutinante .	11
2.7.1. Ensaio em tubo	12
2.7.2. Ensaio em placa de microdiluição ..	12
2.8. Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante por açúcares simples	13
2.9. Fracionamento das proteínas	13
2.9.1. Extração de proteínas de sementes quiescentes	13
2.9.2. Fracionamento das proteínas por diálise	15
2.9.3. Fracionamento de Extrato Total por precipitação salina	15

2.10. Cromatografia de afinidade em Sephadex G-50	15
2.11. Espectro de absorção	16
2.12. Eletroforese em gel de poliacrilamida ...	16
2.12.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS	16
2.12.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS de amostras tratadas com beta-mercaptoetanol ...	17
2.13. Preparação de anticorpos (coelho) contra proteínas de <i>C. brasiliensis</i>	17
2.14. Imunoeletroforese em gel de agarose	18
2.15. Imunoeletroforese em gel de agarose contendo anti-soro (Rocket)	19
2.16. Imunoeletroforese bidimensional em gel de agarose	19
III. RESULTADOS	21
1. Caracterização da semente de <i>C. brasiliensis</i>	21
2. Isolamento e caracterização parcial das lectinas de <i>C. brasiliensis</i>	21
2.1. Extração e fracionamento por diálise das proteínas de <i>C. brasiliensis</i>	21
2.2. Fracionamento do Extrato Total por precipitação com sulfato de amônio	24
2.3. Obtenção da fração F 50/90	24
2.4. Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante da fração F 50/90	24
2.5. Cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 da fração F 50/90	24
2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS	29
2.7. Espectros de absorção	29
3. Comportamento das lectinas durante a germinação e primeiros estágios de desenvolvimento de <i>C. brasiliensis</i>	33

3.1. Condições ótimas de germinação	33
3.2. Peso fresco de cotilédones e eixos	33
3.3. Peso seco de cotilédones e eixos	37
3.4. Teor de proteínas em cotilédones e eixos .	37
3.5. Atividade hemaglutinante	37
3.6. Cromatografia de afinidade de extratos de cotilédones e eixos	43
3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS de extratos de cotilédones	43
3.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS de extratos de eixos	48
3.9. Imunoeletroforese em gel de agarose de ex- tratos de cotilédones	48
3.10. Imunoeletroforese em gel de agarose de ex- tratos de eixos	48
3.11. Imunoeletroforese das frações protéicas em gel de agarose contendo anti-soro con- tra Extrato Total e fração PIII	51
3.12. Imunoeletroforese de extratos de cotilêdo- nes e eixos em gel de agarose contendo an- ti-soro contra Extrato Total e Fração PIII.	51
3.13. Imunoeletroforese bidimensional em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total	57
IV. DISCUSSÃO	67
V. CONCLUSÕES	73
VI. BIBLIOGRAFIA	75
VII. COMUNICAÇÕES A CONGRESSOS	84

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. Propriedades gerais e aplicações das lectinas ..	3
2. Composição mínima das sementes de <i>C. brasiliensis</i>	22
3. Teor de proteína e atividade hemaglutinante em frações de <i>C. brasiliensis</i>	23
4. Teor de proteínas e atividade hemaglutinante nas frações obtidas por precipitação do Extrato Total com sulfato de amônio	25
5. Inibição da atividade hemaglutinante da fração F 50/90 por açúcares simples	27
6. Peso fresco e peso seco de cotilédones ao longo da germinação	34
7. Peso fresco e peso seco de eixos ao longo da germinação	35
8. Teor de proteínas solúveis e atividade hemaglutinante de cotilédones ao longo da germinação ..	39
9. Teor de proteínas solúveis de eixos ao longo da germinação	41

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Placa de microtitulação	14
2. Atividade hemaglutinante das frações precipitadas com sulfato de amônio	26
3. Cromatografia em coluna de Sephadex G-50 da fração F 50/90	28
4. Esquema de obtenção da fração PIII	30
5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS das frações protéicas de <i>C. brasiliensis</i>	31
6. Espectro de absorção do Extrato Total, fração F 50/90 e fração PIII	32
7. Variação de peso fresco de cotilédones e eixos ao longo da germinação	36
8. Variação de peso seco de cotilédones e eixos ao longo da germinação	38
9. Teor de proteínas e atividade hemaglutinante de cotilédones ao longo da germinação.....	40
10. Teor de proteínas de eixos ao longo da germinação	42
11. Cromatografia de afinidade de extrato de cotilédones ao longo da germinação	44
12. Teor de proteínas nas frações PI e PIII obtidas por cromatografia de afinidade de extratos de cotilédones ao longo da germinação	45
13. Cromatografia de afinidade de extrato de eixos ao longo da germinação	46

Figura	Página
14. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS de extratos de cotilédones ao longo da germinação, tratados com beta-mercaptoetanol	47
15. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS de extratos de eixos ao longo da germinação, tratados com beta-mercaptoetanol	49
16. Imunoeletroforese em gel de agarose de extrato de cotilédones ao longo da germinação com anti-soros contra Extrato Total e fração PIII	50
17. Imunoeletroforese em gel de agarose de extrato de eixos ao longo da germinação com anti-soros contra Extrato Total e fração PIII	52
18. Imunoeletroforese de frações protéicas em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total.	53
19. Imunoeletroforese de frações protéicas em gel de agarose contendo anti-soro contra a fração PIII.	54
20. Imunoeletroforese de extratos de cotilédones ao longo da germinação em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total	55
21. Imunoeletroforese de extratos de eixos ao longo da germinação em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total	56
22. Imunoeletroforese de extratos de cotilédones ao longo da germinação em gel de agarose contendo anti-soro contra a fração PIII	58
23. Imunoeletroforese bidimensional de extrato de cotilédones de sementes quiescentes em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total ...	59

24.	Imunoeletroforese bidimensional de extrato de cotilédones de plântulas de 1 dia em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total	60
25.	Imunoeletroforese bidimensional de extrato de cotilédones de plântulas de 3 dias em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total	61
26.	Imunoeletroforese bidimensional de extrato de cotilédones de plântulas de 5 dias em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total	62
27.	Imunoeletroforese bidimensional de extrato de cotilédones de plântulas de 7 dias em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total	63
28.	Imunoeletroforese bidimensional de extrato de cotilédones de plântulas de 9 dias em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total	64
29.	Imunoeletroforese bidimensional de extrato de cotilédones de plântulas de 12 dias em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total ...	65
30.	Imunoeletroforese bidimensional de extrato de cotilédones de plântulas de 15 dias em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total ...	66

DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS

Con A	Concanavalina A
SDS	Dodecil sulfato de sódio
PI	Primeira fração não retida em cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50.
PII	Segunda fração não retida em cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50.
PIII	Fração retida em cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 e eluída com glicose.
$E \frac{1\%}{1\text{cm}}$	Coefficiente de extinção de uma solução a 1% em uma célula de 1cm de caminho ótico.
PHA	Fitohemaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i> .
U.H.	Unidade de hemaglutinação. Definida como o inverso da maior diluição de uma dada solução que ainda é capaz de aglutinar uma suspensão de hemácias a 2% em NaCl 0,15M.

RESUMO

As lectinas de *Canavalia brasiliensis* Mart., presentes exclusivamente nos cotilédones foram isoladas através de extração com solução de NaCl 0,15M, fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50, podendo ser inibidas por glicose, frutose e manose, e requerendo Ca^{++} e Mn^{++} para sua atividade.

A fração isolada por coluna de afinidade (PIII) mostrou uma atividade específica contra hemácias de coelho de 1049 UH/mg de proteína e apresentou um coeficiente de extinção a 280 nm de $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 12,53$. Esta fração por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e beta-mercaptoetanol, apresentou bandas de 8.000, 13.000, 23.000 e 26.000 daltons.

Foi investigado o comportamento das lectinas durante a germinação de sementes de *C. brasiliensis*, e primeiros estágios de desenvolvimento da plântula. As sementes requerem um tratamento prévio com ácido sulfúrico concentrado (50 minutos) para quebrar a dormência. Peso seco, proteínas totais e atividade hemaglutinante dos cotilédones desaparecem paralelamente com a germinação da semente e não foi detectada atividade hemaglutinante no eixo. Por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 notou-se que durante a germinação há uma mobilização diferencial das lectinas e das demais proteínas de peso molecular elevado. As lectinas são mobilizadas mais tardiamente, o que foi confirmado por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS onde se notou que as bandas características da fração PIII permanecem até o fim do experimento (15 dias), a despeito das demais proteínas de peso molecular elevado desaparecerem após 7 dias.

Por imunoeletroforese em gel de agarose, em gel de agarose contendo anti-soro (Rocket) e imunoeletroforese bidimensional foi verificado que os arcos de precipitação devidos às lectinas permanecem até o fim do período estudado, enquanto

que a maior parte das demais proteínas desaparecem a partir dos 9 dias de germinação.

ABSTRACT

The lectins present in the cotyledons of *Canavalia brasiliensis* Mart. were isolated after extraction with 0,15 M NaCl, fractionation with ammonium sulfate and affinity chromatography in Sephadex G-50. These lectins can be inhibited by glucose, fructose and manose and require Ca^{++} and Mn^{++} to show hemagglutinating activity.

A fraction PIII, isolated by affinity chromatography, showed a specific activity against rabbit blood cells of 1049 UH/mg protein and the extinction coefficient ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$) at 280 nm of 12.53. This fraction presented bands of 8000, 13000, 23000 and 26000 daltons in polyacrylamide gel electrophoresis in presence of SDS and B-mercaptoethanol.

The behavior of the lectins of *C. brasiliensis* during the first fifteen days of plant development were investigated. To break seed dormancy, the seeds were treated with concentrated sulphuric acid for 50 min.

During germination there is a gradual reduction in dry weight, total soluble protein and hemagglutinating activity in the cotyledons. No hemagglutinating activity was detected in the axis during plant development. Crude extracts of cotyledons at various stages were passed through affinity column of Sephadex G-50 and their elutions profiles show that there is differential mobilization of the lectins and the other proteins with high molecular weight. After polyacrylamide gel electrophoresis with SDS of the crude extracts it was observed that the other high molecular weight protein bands disappear on the 7 th day. However the lectins were mobilized later as the bands characteristics of the fraction PIII are present until the 15 th day.

It was also shown by agarose gel immunoelectrophoresis, rocket immunoelectrophoresis and crossed immunoelectrophoresis that the immunoprecipitates of the lectins remain until the

end of the experiment. In the case of the other part
of the immunoprecipitates disappear after 9 days.

I. INTRODUÇÃO

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas que se combinam especificamente com receptores (geralmente de natureza glicoprotéica) da superfície celular, ligando-se às células e chegando eventualmente a provocar a aglutinação das mesmas. Essas proteínas são ainda chamadas de fitohemaglutininas, pelo fato de aglutinarem hemácias e serem freqüentemente encontradas em vegetais. Elas podem aglutinar hemácias em certos casos com uma especificidade tão alta que algumas delas são utilizadas na identificação do tipo de sangue e no estudo da estrutura química dos determinantes de grupos sanguíneos. Desta especificidade resultou o nome destas substâncias (lectina vem do latim "legere", escolher). (16,33,35,38,50,65)

A primeira descrição de uma lectina foi feita por Stillmark em 1889, que observou a aglutinação de hemácias quando estudava o efeito tóxico de extratos de sementes de mamona (*Ricinus communis*) sobre o sangue. Após confirmar que o material responsável pela hemaglutinação era uma proteína, Stillmark chamou-a de Ricina (16,38,64). Logo após Hellin descobriu que o extrato tóxico da semente de *Abrus precatorius* também aglutinava hemácias, e a aglutinina foi chamada de Abrina (63). Essas duas proteínas tóxicas constituíram valioso instrumento que auxiliou o bacteriologista Paul Erlich a formular os conceitos fundamentais da imunologia (38,64).

Durante muito tempo as lectinas permaneceram quase como uma curiosidade científica. Só recentemente, com a descoberta de algumas de suas propriedades mais importantes, é que elas passaram a despertar maior interesse dos pesquisadores e têm sido investigadas nos mais diversos sistemas. Apesar de estarem também presentes em bactérias, invertebrados e vertebrados superiores, é principalmente em plantas que elas têm sido estudadas, se mostrando presentes notadamente nas famí-

lias Leguminosae e Euphorbiaceae (16,33,35,38,39,63,65).

A grande maioria das lectinas conhecidas, muitas das quais já foram isoladas e estudadas intensamente, é proveniente de sementes (33,39,40). Embora a semente seja normalmente o órgão mais rico em lectinas, elas também têm sido encontradas em outras partes da planta. Em *Vicia cracca* foi encontrada lectina também em folhas (61). Eisler e Portheim (73) examinando a presença de lectinas em plantas tuberosas, encontraram lectinas em *Helianthus tuberosus* somente em tubérculos. Allen e Neuberger (2) purificaram e caracterizaram uma lectina de tubérculos de *Solanum tuberosum*. Lectinas foram ainda encontradas em casca de *Robinia pseudoacacia* (51). Eisler e Portheim examinando a seiva de 47 espécies de euforbiáceas, usando hemácias de 7 espécies animais, encontraram lectinas não específicas em 26, apesar das sementes de todas as espécies se mostrarem inativas (72,73). Kaus e Glases (36) demonstraram que paredes celulares de hipocótilos de *Vigna radiata* contêm moléculas com atividade hemoaglutinante e Bowles e Kaus (15) mostraram que lectinas com diferentes especificidade de ligação para açúcares estavam presentes em mitocôndrias, aparelho de Golgi, retículo endoplasmático e membranas plasmáticas de células do mesmo feijão.

No decorrer do tempo, diversos autores têm mostrado diferentes propriedades das lectinas, algumas das quais são apresentadas na tabela 1.

Embora as lectinas de *Canavalia brasiliensis* Mart. tenham sido pouco estudadas (25), a Concanavãlina A, lectina extraída de sementes de *Canavalia ensiformis*, é uma das lectinas mais bem estudadas e melhor caracterizadas. A Con A é uma proteína que em pH fisiológico se apresenta como um tetrâmetro de subunidades idênticas, cada uma das quais contém sítios para a ligação de Ca^{++} , Mn^{++} e de açúcares (glicose, manose ou frutose) (12). A forma tetramérica predomina em pH acima de 5,5 e possui um peso molecular de 110.000 daltons aproximadamente (12). O uso da Con A na análise do papel dos saca

TABELA 1: Propriedades gerais e aplicações das lectinas (16, 23, 47, 64, 65, 69)

Propriedade	Aplicação
Aglutinação de eritrócitos	Tipagem sanguínea; estudo de substâncias de grupos sanguíneos; identificação de novos tipos de sangue; diagnóstico de secretores.
Aglutinação de células malignas	Investigação da arquitetura de superfícies celulares e de diferenças de células malignas; base para novas pesquisas na terapia do câncer.
Indução de mitose em linfócitos	Estudo de cromossomas de células; detecção de anormalidades cromossômicas; indução da síntese de imunoglobulinas; estudo de eventos que ocorrem durante a iniciação da divisão celular.
Interação com sacarídeos constituintes de membranas celulares	Investigação da estrutura complexa de carboidratos da superfície de células animais, bactérias e vírus e partículas subcelulares.
Ligação de açúcares	Estudo de sítios específicos de ligação de açúcares nas proteínas.
Toxidez em animais	Estudo do valor nutritivo de alimentos.
Aglutinação de Leucócitos	
Inibição da síntese de proteínas	
Interação com mastócitos e basófilos	

rídios de superfícies celulares, em aplicações biológicas e em isolamento de macromoléculas como polissacarídios e glicoproteínas tem tido muito sucesso devido ao fato dessa lectina poder ser obtida em forma homogênea, ter suas características químicas e tridimensionais definidas e ter sua especificidade de ligação bastante estudada (12). Entre outras aplicações da Con A podemos citar o isolamento de glicoproteínas sanguíneas e de membranas, de vírus, de polissacarídios, de certas enzimas, de células em culturas de tecidos, etc. (12).

Apesar de intensos estudos a função das lectinas nas plantas ainda não foi completamente esclarecida, muito embora existam várias especulações.

Tem sido proposto que lectinas presentes na superfície das raízes de leguminosas podem estar envolvidas na ligação específica de bactérias do gênero *Rhizobium*. Hamblin e Kent (27) mostraram que PHA, a lectina de *Phaseolus vulgaris*, é capaz de prender *Rhizobium phaseoli* (bactéria simbiote de *P. vulgaris*) às raízes do hospedeiro em lugares sensíveis à infecção (pelos radiculares). Dazzo e Brill também detectaram a presença de lectinas nos pelos radiculares de *Trifolium repens* (21). Bhuvanewari et al (9), Bohlool e Schmidt (13), Worpert e Albersheim (77) e Wong (78), trabalhando com diferentes espécies de leguminosas, mostraram a existência de interações entre lectinas dos hospedeiros e as respectivas bactérias simbiotes. Entretanto, Rougé e Labrouse (60) mostraram que apesar de haver interação entre a lectina do hospedeiro e a bactéria simbiote *in vitro*, plântulas de ervilha são infectadas mesmo na ausência de lectinas nos tecidos radiculares. Esses autores sugerem, ao contrário, que as lectinas devem desempenhar um papel de proteção das plantas jovens contra infecções precoces nos primeiros estágios de desenvolvimento.

O fato das lectinas serem comumente encontradas nos órgãos de reserva das plantas aliado ao fato delas se fixarem a açúcares, conduziram Liener em 1964 (38) a formular a hipó-

tese de que as mesmas tinham um papel de transporte e de reserva de açúcares. Entretanto, isto é contraditório para Martin et al. (42) que observaram que os açúcares fixados às lectinas poderiam ser liberados por diálise contra água, e que a diálise de extratos de sementes de *Phaseolus lunatus* não aumentava a atividade hemaglutinante dos mesmos, o que seria observado se as lectinas dentro das sementes estivessem ligadas a açúcares.

Alguns autores, por outro lado, sugerem que as lectinas são "anticorpos vegetais" contra agentes patogênicos. Punin (53) levantou essa possibilidade quando observou que *Bacillus botulinus* e *Bacillus histolyticus* eram aglutinados pelos extratos de *Laburnum alpinum*. As investigações de Albersheim e Anderson em 1971 (1) conduziram ao mesmo gênero de hipótese. Eles observaram que proteínas extraídas de feijão, de tomate e de sicômoro inibem as poligalacturonases dos fungos que atacam estas plantas. Pelo fato dessas enzimas serem utilizadas para hidrolizar as paredes esqueléticas dos hospedeiros, concluíram que as lectinas se opunham à entrada dos fungos. Jansen e Juster (34) observaram que a PHA causava a morte de larvas de gorgulho (*Callosobruchus maculatus*) enquanto que Nordbring-Hertz e Matisson (47) estudando o modo de ação de determinados fungos sobre nematóides, encontraram uma lectina no fungo *Arthrobotrys oligospora*, que o liga a carboidratos da superfície do nematóide atacado.

Recentemente tem sido atribuído às lectinas um papel mitogênico no crescimento dos tecidos vegetais. A lectina de soja interage com células de calos de soja, aumentando o número e o peso das células e a síntese de proteínas, três respostas indicativas de atividade mitogênica (32). Kauss e Glaser (36) sugerem que as lectinas presentes em paredes celulares de vegetais estão envolvidas em processos de crescimento celular. Bangerth et al (8) conseguiram obter a maturação de frutos de tomate por desenvolvimento partenocárpico, borrifando flores de tomateiro que foram impedidas de serem polinizadas com uma solução aquosa de lectina de *Phaseolus vulgaris*. Larkin

(37) observou que lectinas extraídas de *Canavalia ensiformis*, *Glycine max* L., *Ricinus communis* L. e *Arachis hipogaea* L. são capazes de aglutinar protoplastos de diferentes espécies. Shepard e Moore (66) encontraram que a Con A aglutinava plastídios de várias espécies. Finalmente Southworth (68) mostrou que a Con A e a PHA estimulam as anteras de flores de *Lilium longiflorum* a emergirem seus tubos polínicos mais rapidamente.

Howard et al (30) e Hankins (26), trabalhando com lectinas de diferentes espécies, demonstraram através de técnicas imunológicas a conservação de várias regiões nas moléculas de diversas lectinas durante a evolução. Eles concluíram que este fato poderia ser muito valioso para evidenciar funções fisiológicas importantes das lectinas nas plantas. Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira (49) trabalhando com lectinas de três representantes do gênero *Antocarpus*. Este autor encontrou, além de diversas propriedades químicas e fisicoquímicas semelhantes, estreito relacionamento imunológico entre todas essas lectinas, o que o levou a sugerir a conservação de certas partes das moléculas (determinantes antigênicos) durante a evolução das três espécies a partir de um ancestral comum, evidenciando com isso um papel fisiológico importante para as mesmas.

Embora lectinas presentes em sementes quiescentes de várias espécies já tenham sido bastante estudadas, poucos trabalhos existem sobre o comportamento destas proteínas durante a germinação das sementes e primeiros estágios de desenvolvimento das plântulas.

Rougé (57,58) estudando a evolução das lectinas de lentilha durante a germinação observou que as lectinas e as globulinas cotiledonárias desaparecem paralelamente ao longo da germinação, enquanto que as lectinas do embrião desaparecem mais rapidamente do que as demais proteínas embrionárias. Estudando as lectinas de *Pisum sativum*, o mesmo autor observou também que no decorrer da germinação as lectinas presentes no eixo desaparecem rapidamente e aquelas dos cotilédones,

mais lentamente, enquanto que as presentes no tegumento permanecem constante (59). Pueppk et al (52) estudando a distribuição de lectinas de soja nos diferentes tecidos de *Glycine max*, observaram que as mesmas estavam presentes em todos os tecidos da plântulas mas que desapareciam com o desenvolvimento da mesma, não sendo detectadas em plantas com duas a três semanas.

O aparecimento da lectina parece coincidir com o aparecimento da capacidade germinativa, e é possível que ela esteja implicada no controle da divisão celular durante a germinação (4). Renkonen (54) e Renkonen e Karjane (55) constataram que extratos salinos de sementes verdes de *Vicia cracca* inibem as aglutininas normais da planta e que, durante o desenvolvimento da semente, o aparecimento da atividade hemaglutinante coincide com o do poder germinativo da semente. Martin et al (42) estudando o conteúdo de lectinas em *Phaseolus lunatus*, da polinização à germinação, encontraram que durante a maturação da semente havia um aumento na atividade hemaglutinante, apresentando o grão maduro a maior atividade, principalmente nos cotilédones. Trabalhando com *Lens culinaris*, Howard et al (31), observaram que as lectinas presentes nos cotilédones e embriões de sementes maduras desaparecem da planta após a germinação e aparecem durante a maturação. Os trabalhos de Mialonier (43) confirmam esses resultados com *Phaseolus vulgaris*.

O presente trabalho foi realizado com o intuito de contribuir para o esclarecimento do papel fisiológico das lectinas, através do estudo do comportamento dessas proteínas durante a germinação. Foi feito um estudo de isolamento e caracterização parcial de lectinas de uma espécie nativa do gênero *Canavalia* (*Canavalia brasiliensis* Mart.). De posse de algumas de suas propriedades foi investigado o comportamento das lectinas durante a germinação e primeiros estágios de desenvolvimento das plântulas.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. MATERIAIS

1.1. Sementes

No presente trabalho foram utilizadas sementes de *Canna valia brasiliensis* Mart., coletadas no município de Iguatu-CE no ano de 1978.

1.2. Sangue de coelho

Amostras de sangue de coelho foram obtidas de animais adultos e saudáveis criados e mantidos em biotério.

1.3. Outros materiais

Albumina sérica bovina - Fração V 96-99%, lote 126c-0199 da Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Acrilamida e N-N' - metilenobisacrilamida - Eastman Organic Chemicals, Rochester, New York, EUA.

Sephadex G-50 super fina - Pharmacia, Uppsala, Suécia.

5-5-Dietil barbiturato de sódio - E. Merck, Darmstadt, Alemanha.

Ácido dietil barbitúrico - Atlântida Representações e Importações Ltda., RJ, Brasil.

Agarose - Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Dodecil sulfato de sódio - E. Merck, Darmstadt, Alemanha.

Beta-mercaptoetanol - E. Merck, Darmstadt, Alemanha.

Adjuvante completo de Freund - B-D Mérieux, França.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

2. MÉTODOS

2.1. Preparação da farinha de sementes quiescentes

Após a eliminação do tegumento, as sementes quiescentes de *C. brasiliensis* foram moídas em moinho de lâminas (Wiley) acoplado com peneira de 60 malhas/polegada linear (60 mesh). A farinha obtida foi acondicionada em frasco hermeticamente fechado e mantido à temperatura ambiente.

2.2. Condições de germinação

Sementes de *C. brasiliensis* foram imersas em ácido sulfúrico concentrado durante 50 minutos com agitação ocasional e em seguida lavadas exaustivamente com água destilada e imersas em solução de hipoclorito de sódio (5,2% de cloro ativo) por 5 minutos. As sementes foram então colocadas para germinar entre duas folhas de papel de filtro 80g/m² (30 x 30 cm) umedecidas com água destilada e as folhas enroladas sobre si mesmas. Os rolos (5 sementes cada) foram então colocados em cubetas com 100ml de água destilada dispostas dentro de cubas protegidas da luz. Cubas, cubetas e bancada de trabalho foram previamente lavadas e deixadas com solução de hipoclorito de sódio durante a noite.

2.3. Análise elementar

2.3.1. Determinação de umidade

Para a determinação da umidade, pesa-filtros tarados contendo 200mg de amostra foram colocados em uma estufa a 110°C durante 24 horas, e em seguida mantidos em um desseca-

dor até atingir a temperatura ambiente, sendo então, pesados e recolocados na estufa por mais 3 horas, repetindo-se a etapa anterior até se obter pesos constantes. O teor de umidade foi calculado pela perda percentual de peso das amostras.

2.3.2. Determinação de nitrogênio total

O nitrogênio total da farinha de *C. brasiliensis* foi dosado pelo método de semi-micro-Kjeldahl (28).

Para a mineralização foram utilizadas amostras de 200mg, às quais foram adicionados 3ml de ácido sulfúrico concentrado e 0,5ml de sulfato de mercúrio a 14%. Após a mineralização, as amostras foram diluídas com água desionizada para um volume de 100ml. Para a destilação foram usadas alíquotas de 10ml às quais foram adicionados 12ml de NaOH a 50%, 200mg de zinco em pó e 2ml de tiosulfato de sódio a 20% (7). A amônia liberada foi coletada em 10ml de ácido bórico a 2% e titulada com HCl 0,1 N.

2.3.3. Determinação de lipídios totais

O teor de lipídios totais foi determinado conforme descrito por Triebold (70), substituindo-se éter por hexana.

As amostras contendo 2 a 3 g foram pesadas em cartuchos de papel de filtro e colocadas em um extrator Soxhlet com hexana normal. Após a extração o solvente foi evaporado em banho-maria a 70°C e o extrato hexânico pesado. O teor de lipídios foi calculado pela relação entre o peso do resíduo do balão de extração (lipídios extraídos) e o peso seco da amostra e expresso em percentagem.

2.3.4. Determinação de cinzas

Para determinar o teor de cinzas, cápsulas de porcelana contendo de 1 a 2g de amostra foram colocadas em uma mufla a 600°C durante 3 horas, até a incineração completa da maté-

ria orgânica. A seguir a cápsula foi transferida para um dessecador onde permaneceu até atingir a temperatura ambiente, sendo então, determinado o peso do resíduo. O teor de cinzas foi calculado como a relação entre o peso do resíduo e o peso da amostra e expresso em percentagem (70).

2.4. Determinação de peso fresco e peso seco

O peso fresco e o peso seco dos cotilédones e eixos foram determinados a partir de medidas de umidade já descritas no item 2.3.1.

2.5. Preparação de extratos

Cotilédones e eixos (aqui considerados como todo o resto da semente ou da plântula) foram usados separadamente para a preparação de extratos. O material foi macerado em almofariz e extraído com NaCl 0,15 M por 1 hora. Os extratos obtidos foram filtrados em lã de vidro, guardados no congelador e os resíduos desprezados.

2.6. Determinação de proteínas

A concentração de proteínas solúveis nos diversos extratos foi determinada pelo método de microbiureto (6) utilizando-se um espectrofotômetro Beckman DU para se fazer as leituras a 330nm e albumina sérica bovina como padrão.

2.7. Determinação da atividade hemaglutinante

Para a determinação da atividade hemaglutinante foi empregado o método descrito por Moreira (44) modificado para o uso de hemácias de coelho e presença de Ca^{++} e Mn^{++} . Foram usados dois tipos de ensaios detalhados a seguir.

2.7.1. Ensaio em tubo

Este tipo de ensaio foi utilizado para determinações de atividade específica e feito como se segue.

Partindo-se da solução a ser dosada foram feitas, em tubos de hematócrito, diluições seriadas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, etc.) com uma solução de NaCl 0,15 M contendo CaCl_2 2mM e MnCl_2 2mM. A 0,5ml de cada diluição foi adicionado igual volume de uma suspensão de hemácias a 2%. Os tubos foram colocados em um banho-maria a 37°C por 30 minutos, e mantidos posteriormente à temperatura ambiente por mais 30 minutos, sendo então, analisados com respeito à aglutinação das hemácias. O título de hemaglutinação de uma dada amostra foi considerado como sendo o inverso da última diluição que apresentou hemaglutinação total.

2.7.2. Ensaio em placa de microtitulação

Este tipo de ensaio foi usado principalmente para acompanhar a atividade hemaglutinante em efluentes de colunas cromatográficas e para ensaios de inibição, e o equipamento utilizado foi fornecido pela Cook Engineering Company.

A placa de poliestireno (8 x 12 x 1 cm) consiste de 96 poços de fundo cônico dispostos em 8 fileiras de 12 poços (ver figura 1).

O ensaio consistiu em colocar, com o auxílio de uma micropipeta, uma gota (25 μ l) de NaCl 0,15 M contendo CaCl_2 2mM e MnCl_2 2mM em cada poço. A seguir, usando-se microdiluidores, que também transferem 25 μ l, foram feitas diluições seriadas ao longo de cada fileira. Então, com a micropipeta, foi adicionada uma gota de uma suspensão de hemácias a 2% (em NaCl 0,15 M) em cada poço. Em seguida as placas foram incubadas por 30 minutos a 37°C e deixadas à temperatura ambiente por mais 30 minutos. Os títulos foram determinados observando-se a maior diluição que ainda apresentou hemaglutinação total.

2.8. Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante por açúcares simples

O ensaio de inibição da atividade hemaglutinante da fração F 50/90 de *C. brasiliensis* (5mg/ml) foi realizado em placas utilizando-se soluções (1 M) de glicose, frutose e manose e hemácias de coelho a 2%.

Em uma placa de microtitulação foram feitas diluições seriadas (no sentido de A para H) da solução do açúcar sob investigação com NaCl 0,15 M contendo CaCl_2 2mM e MnCl_2 2mM. A seguir, foram feitas diluições seriadas da fração ativa (no sentido de 1 para 12) (Fig. 1). Após 30 minutos à temperatura ambiente, foi adicionada em cada poço 1 gota da suspensão de hemácias e a placa colocada na estufa (37°C) por 30 minutos e em seguida à temperatura ambiente por mais 30 minutos, quando os títulos de hemaglutinação foram determinados como descrito no item 2.7.1.

2.9. Fracionamento das proteínas

2.9.1. Extração de proteínas de sementes quiescentes

Farinha de sementes quiescentes de *C. brasiliensis*, preparada como descrito no item 1, foi submetida à extração com NaCl 0,15 M durante 4 horas à temperatura ambiente com agitação ocasional. Após esse tempo o material foi centrifugado a 16.000 xg por 20 minutos a 4°C sendo o precipitado desprezado. O sobrenadante, aqui denominado de Extrato Total, foi então dialisado contra tampão acetato 0,033 M pH 5,0 durante 24 horas a 7°C seguido de diálise contra água por mais 24 horas também a 7°C. Após liofilização, o material foi estocado a 7°C para uso posterior.

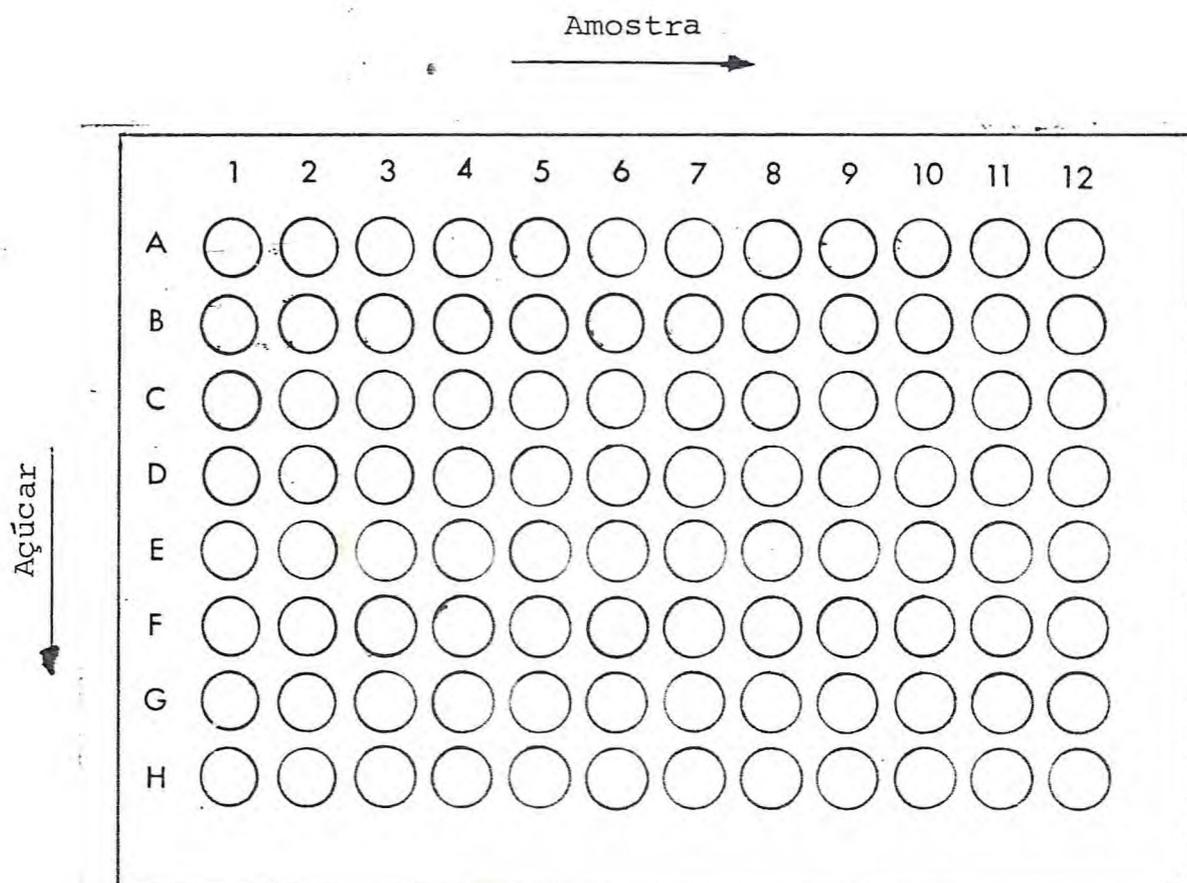


Figura 1 - Placa de microtitulação

2.9.2. Fracionamento das proteínas por diálise

As albuminas e as globulinas foram obtidas a partir de Extrato Total dialisado contra tampão acetato 0,033 M pH : 5,0 e contra água (ver item anterior) e centrifugado a 16.000 xg por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante (albuminas) e o precipitado (globulinas) foram então liofilizados e guardados a 7°C para uso posterior.

2.9.3. Fracionamento do Extrato Total por precipitação salina

O Extrato Total foi submetido à precipitação com diferentes concentrações de sulfato de amônio, por um período de 4 horas a temperatura ambiente com agitação ocasional. Após centrifugação a 16.000 xg por 20 minutos a 4°C, os precipitados foram ressuspensos, dialisados exaustivamente contra água destilada, liofilizados e estocados a 7°C para uso posterior.

2.10. Cromatografia de afinidade em Sephadex G-50

Os experimentos de cromatografia de afinidade em Sephadex G-50 foram desenvolvidos em uma coluna medindo 19 x 1,3cm, preparada segundo Determan (22). O gel foi deixado entumescer em água por 24 horas, e a coluna preparada deixando-se o gel sedimentar por gravidade, sendo a seguir equilibrada com NaCl 1 M contendo CaCl₂ 5mM e MnCl₂ 5mM. A amostra dissolvida na solução de equilíbrio, foi aplicada à coluna e eluída, inicialmente com a mesma solução até liberação de todo o material não retido, sendo então eluída com uma solução de glicose 0,1 M na solução de partida. Toda a eluição foi feita a um fluxo constante de 30ml/h e a absorbância a 280nm do efluente foi acompanhada em um sistema LKB-Uvicord II. Os efluentes da coluna, recolhidos em um coletor LKB KadiRac, tiveram posteriormente suas absorbâncias determinadas a 280nm (espectrofotômetro Beckman DU), e a atividade hemaglutinante determinada pelo método de aglutinação já des-

crito em 2.7.2.

2.11. Espectros de absorção

Os espectros de absorção das diferentes frações foram determinados utilizando-se um espectrofotômetro Varian de duplo-feixe, com cubetas de quartzo de 1cm de caminho ótico. As soluções foram preparadas dissolvendo-se as frações em NaCl 0,15 M.

2.12. Eletroforese em gel de poliacrilamida

2.12.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

Os experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS foram desenvolvidos segundo Weber e Osborn (75), e os pesos moleculares determinados segundo Xavier Filho e Moreira (79).

As amostras liofilizadas das diversas frações (Extracto Total, albuminas, globulinas, frações precipitadas com sulfato de amônio, frações obtidas por filtração em gel e extratos de cotilédones e de eixos de sementes quiescentes e de plântulas) (2mg/ml) foram dissolvidas em tampão fosfato 0,01 M pH 7,0 contendo 1% de SDS e deixadas em repouso por uma noite. Antes da aplicação a cada amostra foram adicionados azul de bromofenol a 0,05% (para visualização da frente de corrida) e sacarose a 20% para torná-las mais densas e facilitar a aplicação. Para cada fração foram aplicadas amostras de 20 e 50µl. Foi usada uma corrente constante de 7mA por tubo durante cerca de 4 horas. A localização das bandas de proteína foi feita imergindo-se as colunas de gel em uma solução de Coomassie Brilliant Blue 0,005% em metanol + ácido acético + água (5 + 1 + 5), durante pelo menos 16 horas. O descoramento foi feito em uma solução de ácido actético a 7%.

2.12.2. Eletroforese de amostras tratadas com beta-mercaptoetanol em gel de poliacrilamida contendo SDS

Os experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS de amostras tratadas com beta-mercaptoetanol foram feitos seguindo-se de perto o método de Weber e Osborn (75) e os pesos moleculares calculados segundo Xavier-Filho e Moreira (79).

As amostras (as mesmas usadas no item anterior) foram dissolvidas em tampão fosfato 0,01 M pH 7,0 contendo SDS 1% e beta-mercaptoetanol 1%, e incubadas a 100°C por 10 minutos.

As eletroforeses foram desenvolvidas nas mesmas condições do item anterior.

2.13. Preparação de anticorpos (coelho) contra proteínas de *C. brasiliensis*

Dois coelhos devidamente marcados foram sensibilizados, um com o Estrato Total de *C. brasiliensis* e outro com a fração PIII obtida por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 da fração F 50/90 de *C. brasiliensis*.

Em cada coelho a sensibilização inicial foi feita por injeção intramuscular na coxa, de 10mg de amostra dissolvidos em 0,5ml de NaCl 0,15 M + 0,5ml de adjuvante completo de Freund. Após 21 dias foi feito o primeiro reforço, que consistiu em injeção subcutânea, nas costas, de 10mg de amostra dissolvidos em 1,0ml de NaCl 0,15 M. No 36º dia foi feita a primeira sangria na orelha e dado um novo reforço, igual ao anterior. A partir de então, de 7 em 7 dias, foram feitas sangrias e reforços, até se obter quantidades satisfatórias de anti-soro. Em cada sangria, o sangue foi deixado coagular a 37°C por 1 hora e o soro obtido foi separado dos coágulos por centrifugação a 4.800 xg por 15 minutos. Após a obtenção de quantidades suficientes, os anti-soros foram reunidos e preci

pitados com uma solução de sulfato de amônio a 33% de saturação por 4 horas. Após centrifugação (4.800 xg por 20 minutos) o precipitado foi ressuscitado e dialisado contra água por 24 horas, liofilizado e estocado a 7°C em ambiente seco.

Antes da sensibilização dos animais, soro foi colhido e usado como controle nos experimentos imunológicos.

2.14. Imunoeletroforese em gel de agarose

Os experimentos de imunoeletroforese foram feitos seguindo-se de perto a técnica descrita por Clausen (19) utilizando-se agarose a 1% com azida sódica a 0,02% em tampão Veronal 0,075 M pH 8,6 contendo lactato de cálcio 0,08% (tampão Veronal Ca). Em cada placa foram feitas duas canaletas, uma para receber o anti-soro contra o Extrato Total de *C. brasiliensis* e a outra o anti-soro contra o pico ativo PIII, e um poço entre as canaletas, onde foi aplicada a amostra (antígenos).

A eletroforese foi desenvolvida durante 3 horas com tensão constante de 7 volts/cm. Após a corrida eletroforética, os anti-soros foram postos nas canaletas e deixados difundir. Estabelecidos os arcos de precipitação, o material solúvel foi retirado por imersão das placas em solução salina 0,9% durante pelo menos 48 horas, seguida de lavagem em água destilada por 1 hora, após o que as placas foram postas a secar em estufa a 37°C. A revelação foi feita por coloração em Ponceau S (0,1% em ácido acético 2%) seguido de Verde Brilhante (0,1% em ácido acético 2%) e o excesso de corante retirado com uma solução de ácido acético 7%.

Esta técnica foi utilizada para a análise de extratos de cotilédones e eixos de sementes quiescentes e de plântulas com diferentes dias de germinação.

2.15. Imunoeletroforese em gel de agarose contendo anti-soro

Estes experimentos foram feitos em placas de vidro (10 x 9 x 0,1 cm) seguindo-se de perto o método descrito por Weeke (76).

Gel de agarose a 1% (10ml) preparado conforme o item anterior e contendo o anti-soro desejado a uma concentração de 0,1% foi deixado solidificar entre duas placas de vidro separadas por um espaçador de 1mm. Após solidificação uma das placas de vidro e o espaçador foram retirados e no gel foram feitos poços a 1cm da base e separados 0,6cm um do outro. A cada poço foi aplicado 7 μ l de uma solução (20mg/ml) da amostra a examinar, e a eletroforese foi desenvolvida em corrente constante de 20 volts/cm por 15 horas. Após a eletroforese, as placas foram lavadas, secas e coradas nas mesmas condições do item anterior.

2.16. Imunoeletroforese bidimensional em gel de agarose

Os experimentos foram feitos em placas de vidro (10 x 9 x 0,1cm) seguindo-se de perto a técnica descrita por Weeke (76).

Gel de agarose a 1% (2ml) preparado conforme o item 2.14. foi deixado solidificar entre duas placas de vidro separadas por um espaçador de 1mm. Após solidificação uma das placas e o espaçador foram retirados, aparando-se as extremidades do gel para ficar com uma largura de 1cm, fazendo-se um poço em uma das extremidades. Neste poço aplicou-se 5 μ l da amostra a ser analisada (50mg/ml) e a eletroforese foi desenvolvida em corrente constante de 30 volts/cm por 3 horas. Após esta primeira eletroforese, as placas foram remontadas com o espaçador e foi colocado entre as mesmas gel de agarose a 1% (8ml) contendo o anti-soro desejado (0.1%). Após solidificação (onde os dois géis ficaram perfeitamente unidos), o espaçador e uma das placas foram retirados e uma segunda eletrofo

rese (no sentido perpendicular à primeira) foi desenvolvida com uma corrente constante de 20 volts/cm por 15 horas. Finalmente as placas foram lavadas, secadas e coradas conforme o item 2.14.

III. RESULTADOS

1. CARACTERIZAÇÃO DA SEMENTE DE *Canavalia brasiliensis*

A semente de *C. brasiliensis* é caracterizada por apresentar cor escura, forma elíptico-oval, achatada, com hilo oblongo e ter um peso médio de 0,8g, 75,3% do qual é constituído pela amêndoa.

Quando foi determinada a composição mínima da semente de *C. brasiliensis*, foram encontrados os resultados apresentados na Tabela 2, onde se nota um elevado teor de proteína e um baixo conteúdo de lipídios.

2. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS LECTINAS DE *C. brasiliensis*

2.1. Extração e fracionamento por diálise das proteínas de *C. brasiliensis*

Quando a farinha de sementes quiescentes (sem tegumento) foi submetida a extração com NaCl 0,15 M na proporção de 1:20 (p/v) e posterior fracionamento por diálise contra tampão acetato 0,033 M pH 5,0 e seguido de diálise contra água, foram obtidos de resultados apresentados na Tabela 3.

Pelos resultados obtidos pode-se notar que a quase totalidade das proteínas e da atividade hemaglutinante extraídas estão localizadas nas globulinas. A dependência da atividade com relação a Ca^{++} e Mn^{++} foi testada, encontrando-se que os títulos de hemaglutinação só são repetitivos em concentrações a partir de 2mM.

TABELA 2 - Composição mínima de sementes de *C. brasiliensis* com base no peso seco e expressa em percentagem

Constituinte	teor na amostra (%)	
	semente íntegra	amêndoa
Umidade	(9,13)	(12,47)
Proteína bruta*	29,10	38,24
Lipídios	1,50	2,05
Glicídios**	65,88	56,53
Cinzas	3,52	3,18

* Nitrogênio total x 6,25

** Obtido por diferença

TABELA 3 - Teor de proteína e atividade hemaglutinante em frações de *Canavalia brasiliensis*

Fração	teor de proteína mg P/g de farinha	atividade hemaglutinante		purificação x
		UH/g farinha	UH/mg proteína	
Extrato Total	142,6	3.792	26,6	1
Albumina	3,9	118	30,0	1,13
Globulina	109,9	3.593	32,7	1,23
F 0/50	20,2	1.030	51,0	1,90
F 50/90	65,1	8.507	130,6	4,90
PIII (tratado)	22,4	23.551	1.049,2	39,4

2.2. Fracionamento do Extrato Total por precipitação com sulfato de amônio

Os resultados obtidos quando o Extrato Total foi submetido a fracionamento por precipitação com sulfato de amônio são apresentados na Tabela 4 e Figura 2, onde se pode observar que apenas 5% da atividade hemaglutinante encontrada até 90% precipita com 50% de saturação.

2.3. Obtenção da fração 50/90

De posse dos dados obtidos no fracionamento, tanto por diálise como por precipitação com sulfato de amônio, foi escolhida a fração do extrato total que precipita entre 50 e 90% de saturação para fracionamento posterior.

2.4. Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante da fração F 50/90

Os resultados obtidos quando foi investigada a inibição da atividade hemaglutinante da fração F 50/90 de *C. brasiliensis* por açúcares simples são apresentados na Tabela 5, onde podemos ver que dos três açúcares estudados, a glicose se mostra mais potente em inibir a atividade.

Foi investigada ainda a interação entre lectina e soro normal de coelho, tendo sido encontrado que, embora não havendo precipitação do soro com a lectina, alguma substância do soro inibia a atividade hemaglutinante, sendo 1ml de soro capaz de inibir a atividade de 1,31mg da fração.

2.5. Cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 da fração F 50/90

A Figura 3 mostra os resultados obtidos quando a fração F 50/90 foi fracionada em coluna de Sephadex G-50. Pode-se notar que embora tenha havido uma perda de atividade na

TABELA 4 - Teor de proteína e atividade hemaglutinante no Extrato Total e nas frações obtidas por precipitação com sulfato de amônio

intervalo de saturação (%)	teor de proteína	atividade hemaglutinante	
	mg/g de farinha	UH/g de farinha	UH/mg de proteína
Extrato Total	142,60	3.792	26,6
0/20	5,53	160	28,9
0/30	7,63	80	10,5
0/40	14,06	240	17,1
0/50	20,20	400	19,8
0/60	36,24	2.560	70,6
0/70	65,86	5.120	77,7
0/80	84,95	7.680	90,4
0/90	85,34	7.680	90,0
0/100	68,31	3.840	56,2

Figura 1 - Atividade hemaglutinante das frações precipitadas
com sulfato de amônio a diversos níveis de satura
ção.

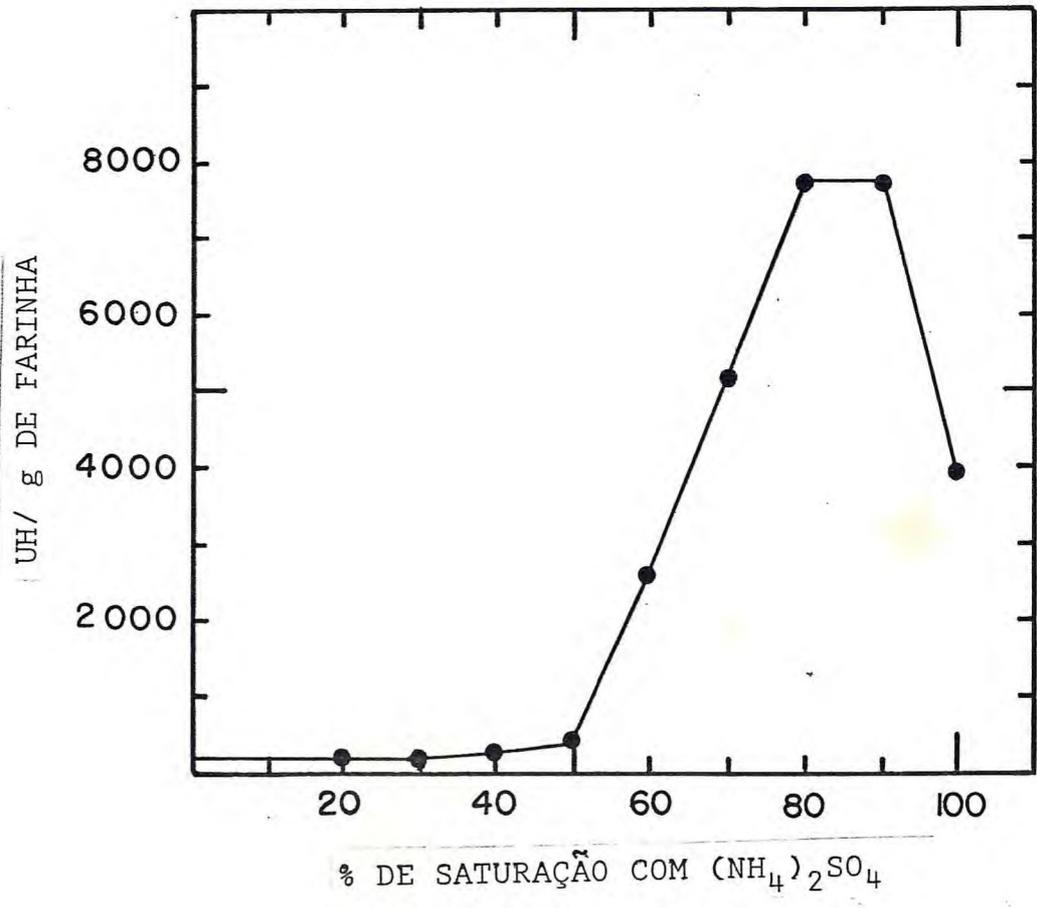


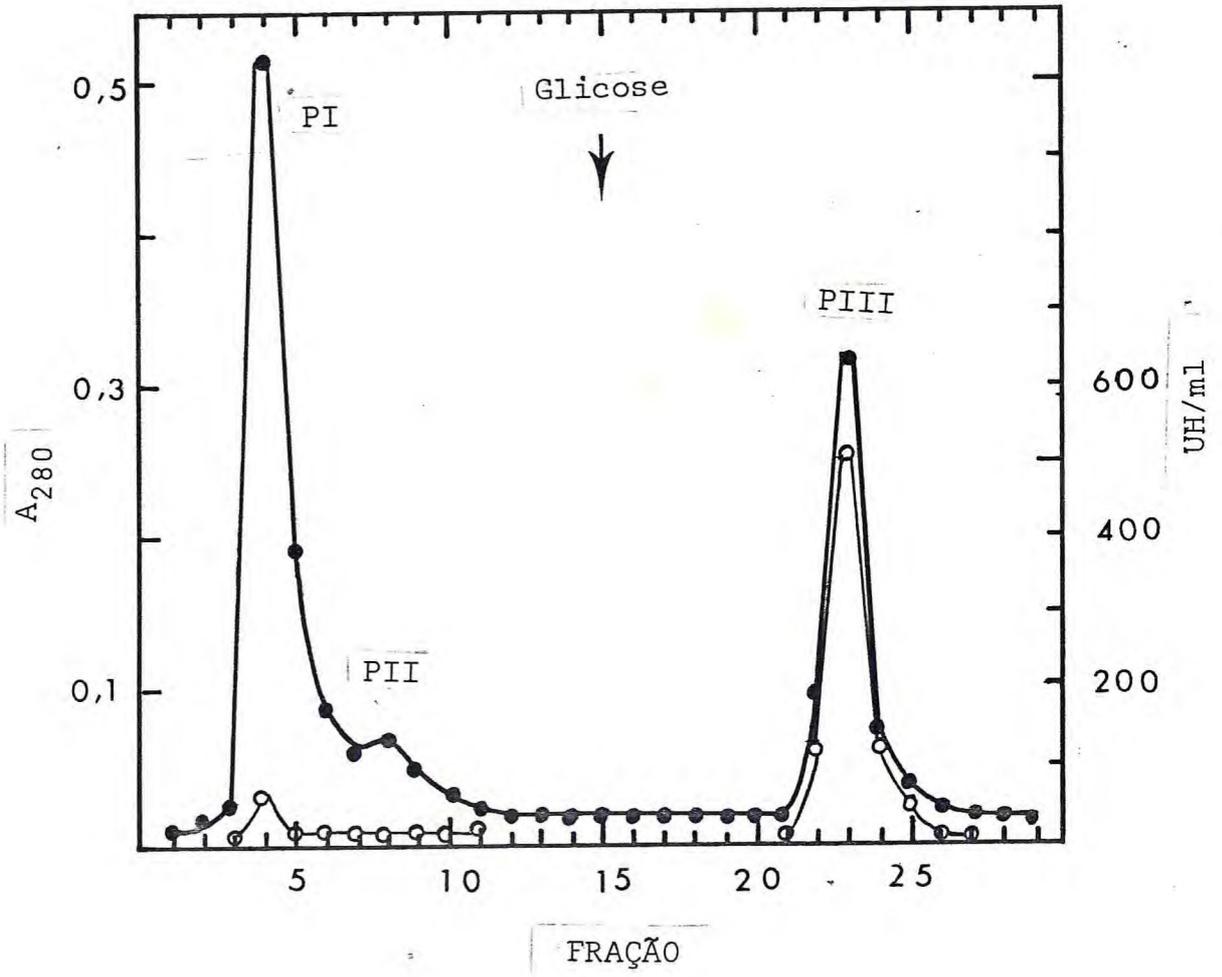
TABELA 5 - Inibição da atividade hemaglutinante da fração F 50/90 por açúcares simples.

Açúcar	mg de açúcar/mg de proteína*
Glicose	31,91
Manose	143,16
Frutose	282,13
Galactose	não inibiu

* mg de açúcar necessários para inibir a atividade hemaglutinante de 1mg de fração F 50/90 de *C. brasiliensis*.

Figura 3 - Cromatografia de afinidade da fração F 50/90 em co-
luna de Sephadex G-50 equilibrada com NaCl 1 M con-
tendo CaCl_2 5mM e MnCl_2 5mM, seguido de NaCl 1 M
contendo CaCl_2 5mM, MnCl_2 5mM e glicose 0,1 M.
Amostra: 10mg/2ml. Fluxo: 30ml/hora. Frações: 3,6ml

(●—●—) A_{280} nm (○—○—) U.H.



fração não retida, praticamente toda a atividade foi eluída na fração PIII.

A fração PIII foi dialisada exaustivamente contra NaCl 0,15 M e em seguida contra água. Apesar desses tratamentos a atividade específica permaneceu baixa (possivelmente inibida por glicose residual). Quando porém, a fração foi incubada com ácido acético 1 M por 20 minutos, e dialisada exaustivamente contra NaCl 0,15 M, a atividade específica foi aumentada cerca de 10 vezes, conforme pode ser visto na Tabela 3.

O esquema geral de obtenção da fração PIII é mostrado na Fig. 4.

2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS

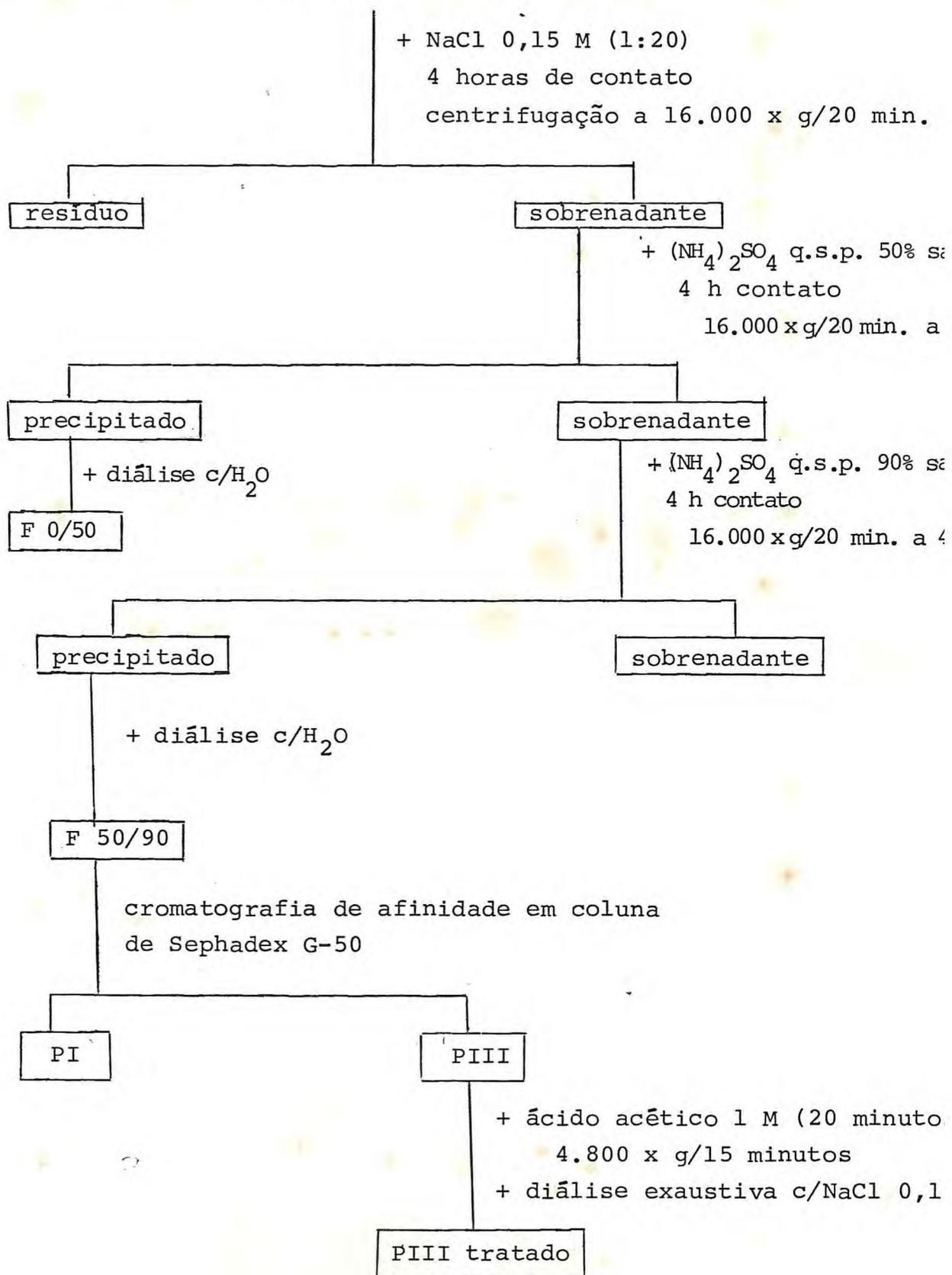
A figura 5A mostra os resultados obtidos quando Extrato Total, Albuminas, Globulinas e frações F 0/50, F 50/90, PI e PIII foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS. As bandas visíveis nesses experimentos variam dentro de uma faixa de pesos moleculares de 10.000 a 50.000 daltons, quatro das quais (8.000, 13.000, 23.000 e 26.000 daltons) estão presentes em todas as frações ativas, apresentando-se a fração PIII composta predominantemente pela banda de peso molecular de 26.000 daltons.

As mesmas amostras, quando tratadas previamente com beta-mercaptoetanol, e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS são mostradas na Figura 5B, onde se verifica que o número e o tipo de bandas é praticamente o mesmo do tratamento anterior.

2.7. Espectros de absorção

Quando foram determinados os espectros de absorção do Extrato Total, fração 50/90 e fração PIII (tratada com ácido acético), foram obtidos os resultados mostrados na figura 6.

Figura 4 - Esquema de obtenção da fração ativa PIII a partir da farinha de *C. brasiliensis*.

Farinha de *C. brasiliensis*

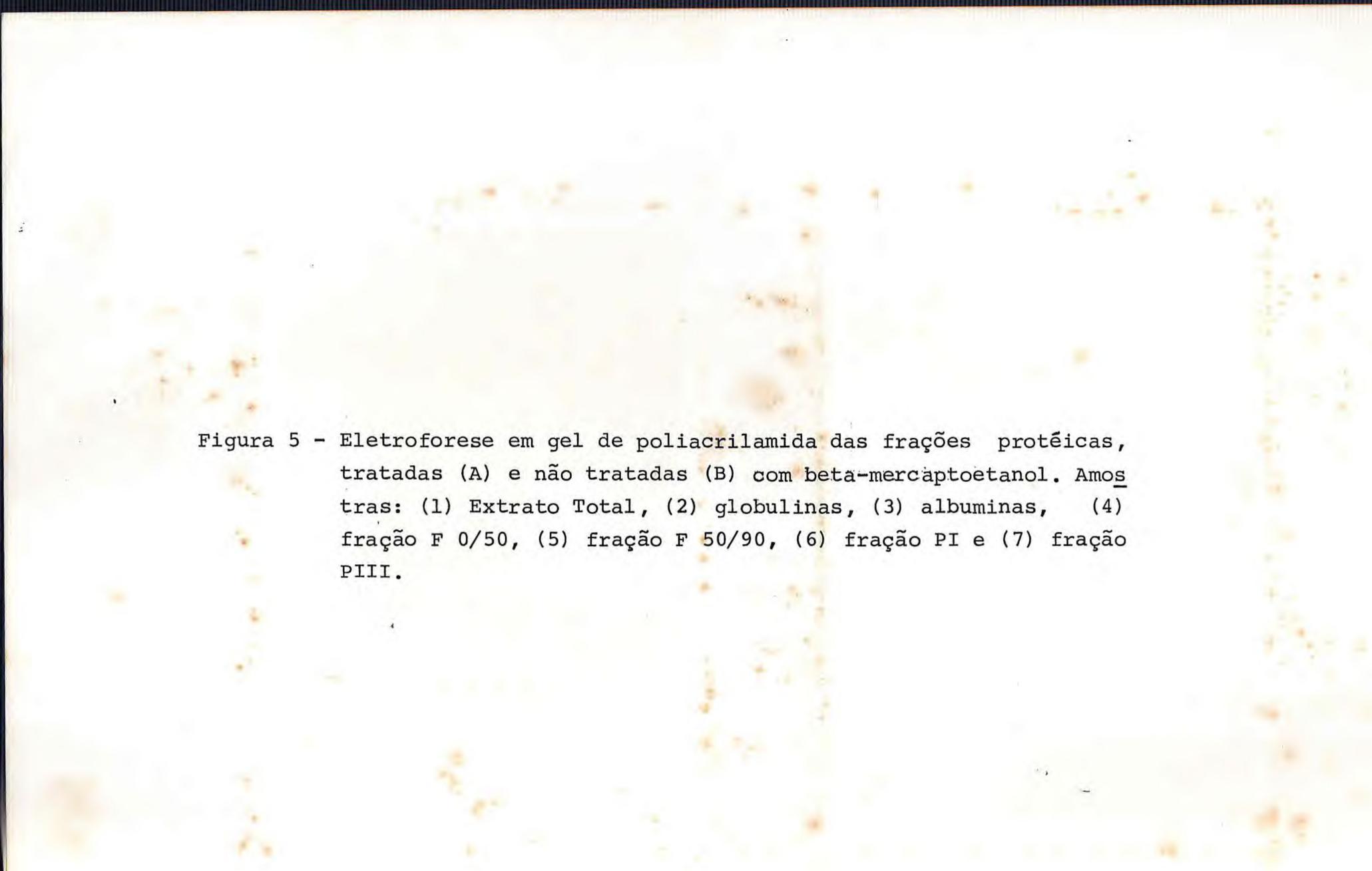


Figura 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações protéicas, tratadas (A) e não tratadas (B) com beta-mercáptoeanol. Amostras: (1) Extrato Total, (2) globulinas, (3) albuminas, (4) fração F 0/50, (5) fração F 50/90, (6) fração PI e (7) fração PIII.

PM X 10⁻³
50
25
10



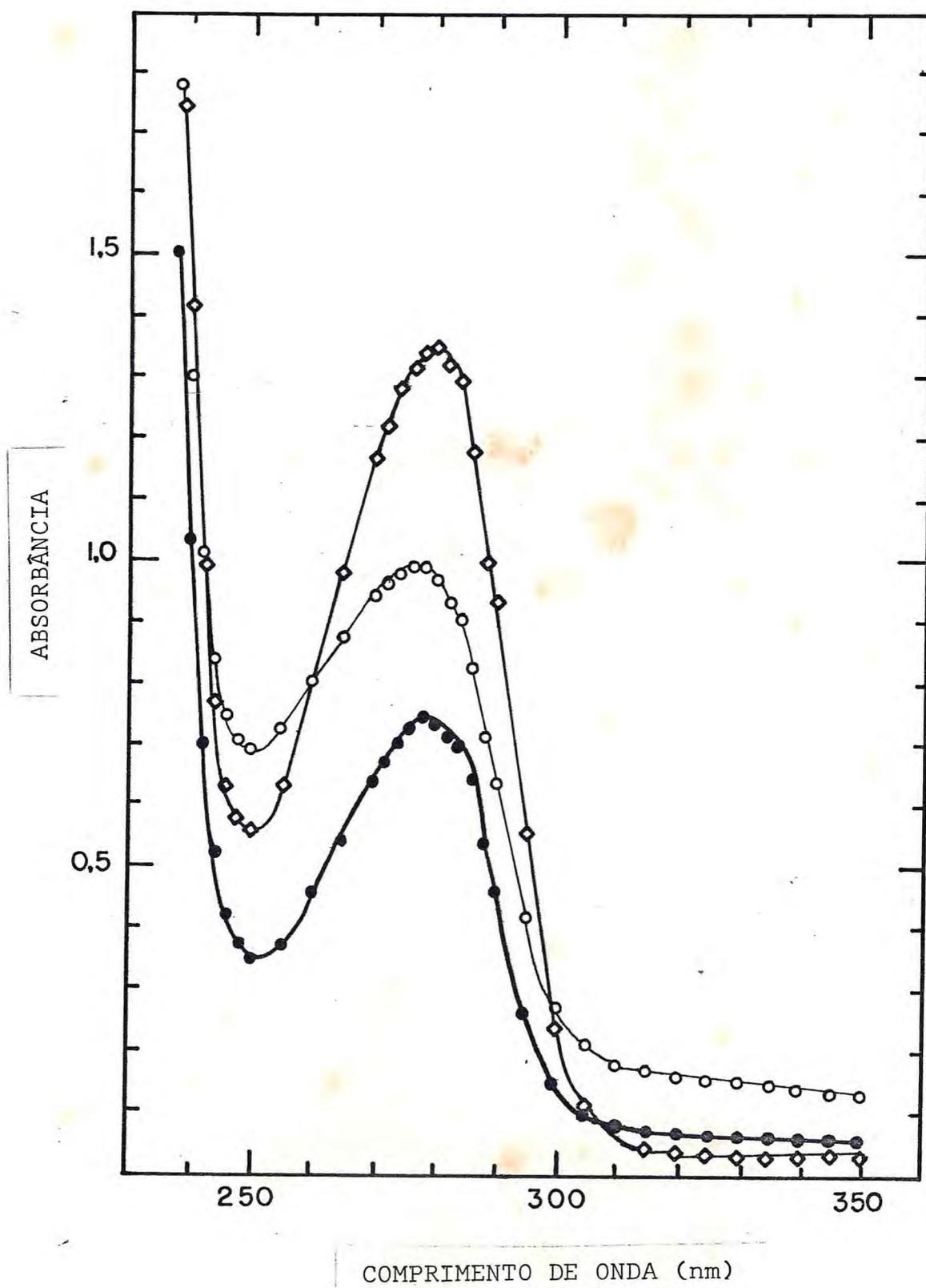
A

PM X 10⁻³
50
25
10



B

Figura 6 - Espectro de absorção do Extrato Total (o—o), fração F 50/90 (o—o) e fração PIII (■—■) de *C. brasiliensis*, dissolvidas em NaCl 0,15 M.



Os espectros foram determinados a partir de soluções contendo 0,77, 0,76 e 1,0mg/ml (determinadas pelo método de microbiureto) de proteína, respectivamente.

Foi encontrado, a partir desses dados o valor de $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 13,52$ para o coeficiente de extinção da fração PIII.

3. COMPORTAMENTO DAS LECTINAS DURANTE A GERMINAÇÃO E PRIMEIROS ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DE *C. brasiliensis*

3.1. Determinação das condições ótimas de germinação

As sementes de *C. brasiliensis* não foram capazes de germinar sem tratamento prévio para quebrar a dormência. Com a finalidade de se encontrar as condições ótimas, as sementes foram tratadas com ácido sulfúrico concentrado por diferentes períodos de tempo (desde 5 até 60 minutos), tendo-se encontrado o tempo de 50 minutos como aquele em que apresentou uma maior percentagem de germinação e uma maior uniformidade das plântulas.

3.2. Peso fresco de cotilédones e eixos

Quando foi investigada a variação de peso fresco de cotilédones e de eixos (aqui compreendido como o resto da semente ou da plântula depois de retirados os cotilédones), de sementes quiescentes e de plântulas de *C. brasiliensis*, durante o período estudado (Tabela 6 e 7 e Figura 7), foi notado que embora o peso fresco do eixo cresça continuamente durante todo o período investigado (no 15º dia atinge cerca de 650 vezes o valor inicial), o peso fresco dos cotilédones cresce até o 5º dia, decrescendo lentamente a partir daí, para alcançar no 15º dia um valor ainda elevado (cerca de 1,5 vezes o valor inicial).

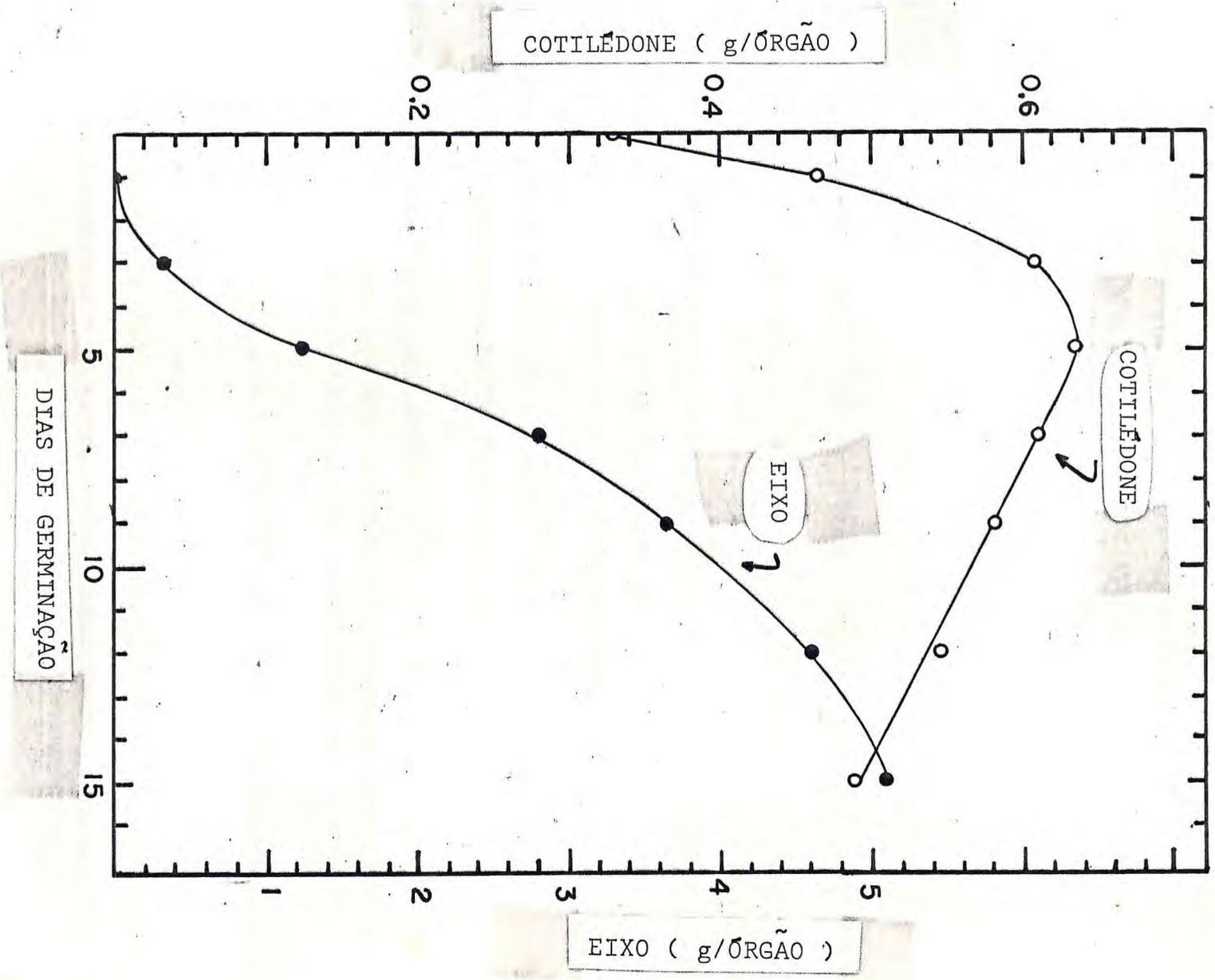
TABELA 6 - Peso fresco e peso seco de cotilédones de *C. brasiliensis* ao longo da germinação

Cotilédones (dias)	Peso fresco mg/parte	Peso seco mg/parte
0	329,8	305,5
1	464,9 ± 30,7	305,5 ± 16,0
3	607,5 ± 30,6	266,3 ± 0,5
5	636,4 ± 37,0	198,8 ± 16,5
7	609,4 ± 26,0	123,6 ± 6,4
9	582,4 ± 44,0	71,6 ± 8,5
12	546,4 ± 53,2	48,4 ± 4,5
15	486,9 ± 60,3	30,2 ± 2,4

TABELA 7 - Peso fresco e peso seco de eixos de *C. brasiliensis* ao longo da germinação

Eixos (dias)	Peso fresco mg/parte	Peso seco g/parte
0	7,8	6,8
1	11,8 ± 4,6	6,8 ± 0,33
3	323,4 ± 19,8	38,7 ± 8,41
5	1.250,6 ± 109,5	116,1 ± 5,40
7	2.906,2 ± 128,0	224,4 ± 28,40
9	3.620,7 ± 168,8	330,3 ± 44,80
12	4.585,4 ± 601,0	345,1 ± 6,40
15	5.096,0 ± 468,0	357,9 ± 0,10

Figura 7 - Variação de peso fresco de cotilédones e eixos
de sementes quiescentes e de plântulas de *C. b.
siliensis* ao longo da germinação.



3.3. Peso seco de cotilédones e eixos

Quando foi acompanhada a variação de peso seco de cotilédones e de eixos de sementes quiescentes e de plântulas com diferentes dias (Tabela 6 e 7 e Fig. 8), foi notado que, enquanto o peso seco dos eixos cresce com o tempo de germinação, atingindo no 15º dia um valor de 50 vezes o valor inicial, o peso seco dos cotilédones decresce continuamente, até atingir naquele dia o valor de 10% do peso inicial.

3.4. Teor de proteínas em cotilédones e eixos

Os teores de proteínas solúveis de cotilédones de sementes quiescentes e de plântulas durante a germinação de *C. brasiliensis* são mostrados na Tabela 8 e na Figura 9, onde se nota um decréscimo durante todo o período estudado, atingindo no 15º dia um teor igual a apenas 3,4% do valor inicial.

Os teores de proteínas solúveis de eixos de sementes quiescentes e de plântulas durante a germinação de *C. brasiliensis* são mostrados na Tabela 9 e na Fig. 10, onde se nota um aumento até o 9º dia (cerca de 27 vezes o valor inicial) decrescendo, então, até o 15º dia.

3.5. Atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante em cotilédones de sementes quiescentes e de plântulas durante a germinação de *C. brasiliensis* é mostrada na Tabela 8 e na Figura 9, onde se nota um aumento de atividade no 1º dia e um subsequente decréscimo ao longo da germinação até desaparecer quase totalmente (1,2% do valor inicial) no 15º dia.

Quando experimentos semelhantes foram feitos com extratos de eixos, entretanto, não foi detectada qualquer atividade hemaglutinante durante todo o período estudado.

Figura 8 - Variação de peso seco de cotilédones e eixos de se mentes quiescentes e de plântulas de *C. brasiliensis* ao longo da germinação.

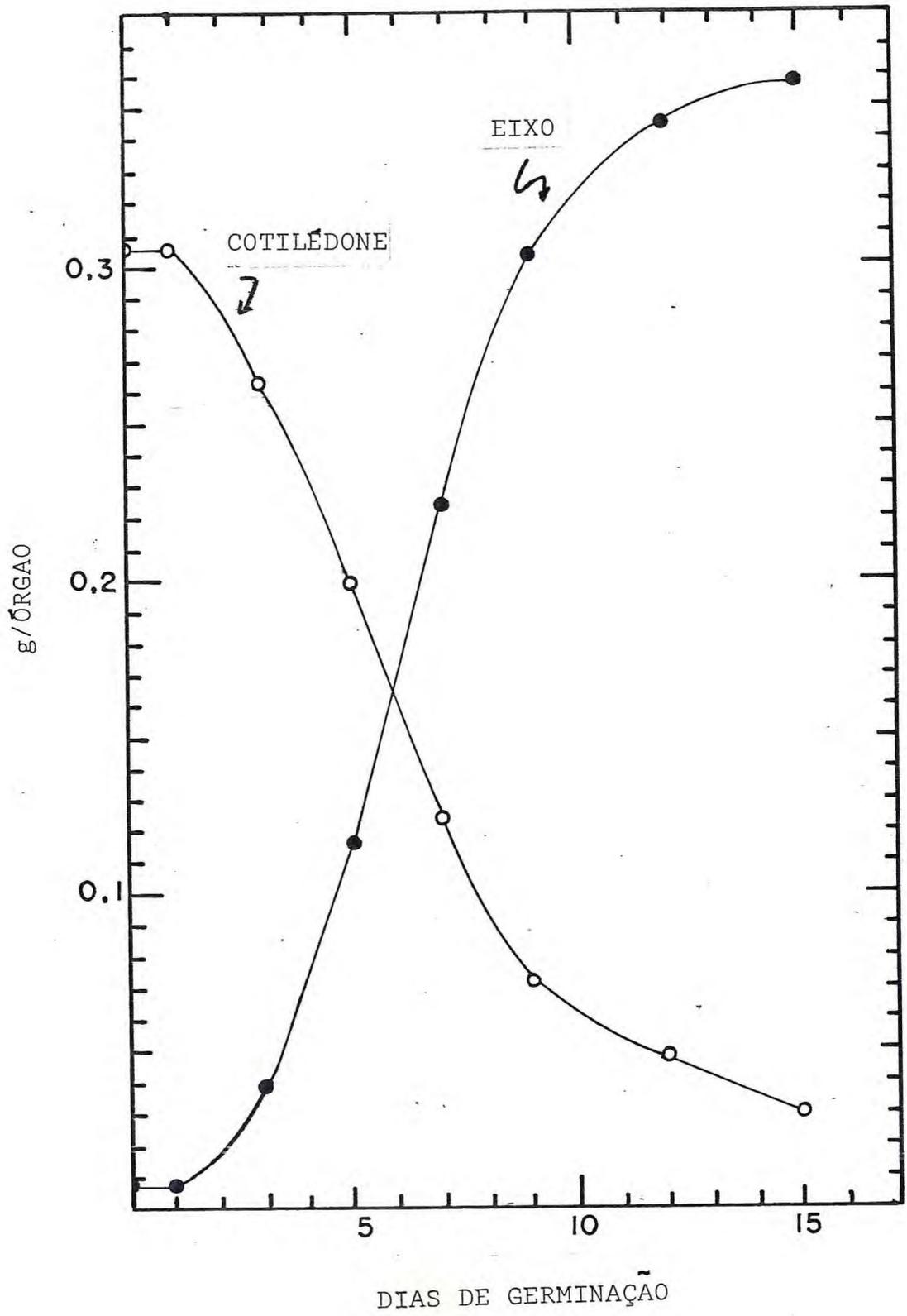


TABELA 8 - Teor de proteínas solúveis e atividade hemaglutinante em cotilédones de *C. brasiliensis* ao longo da germinação

Cotilédones (dias)	mg P/parte	UH/parte	UH/mg P
0	49,95	8.694	174,1
1	45,51 ± 3,15	12.490 ± 510	274,5
3	47,32 ± 0,73	10.397 ± 2.956	219,7
5	36,53 ± 4,37	7.956 ± 2.928	217,8
7	17,80 ± 4,88	6.227 ± 240	349,8
9	7,20 ± 2,25	1.555 ± 314	216,0
12	6,30 ± 0,97	552 ± 366	87,6
15	1,68 ± 0,15	105 ± 46	62,5

Figura 9 - Teor de proteínas (●—●—●) e atividade hemaglutinante (○—○—○) de cotilédones de sementes quiescentes e de plântulas de *C. brasiliensis* ao longo da germinação.

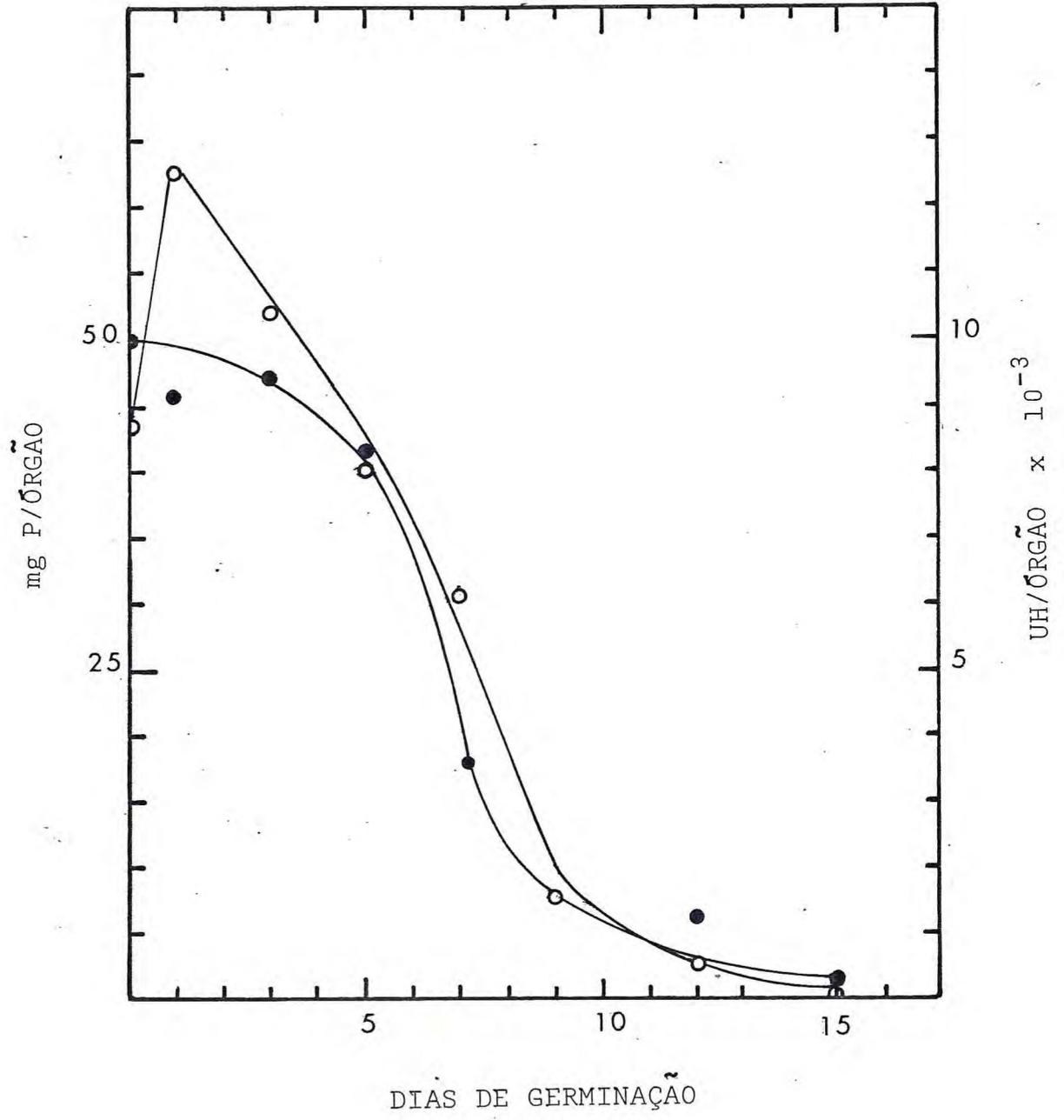
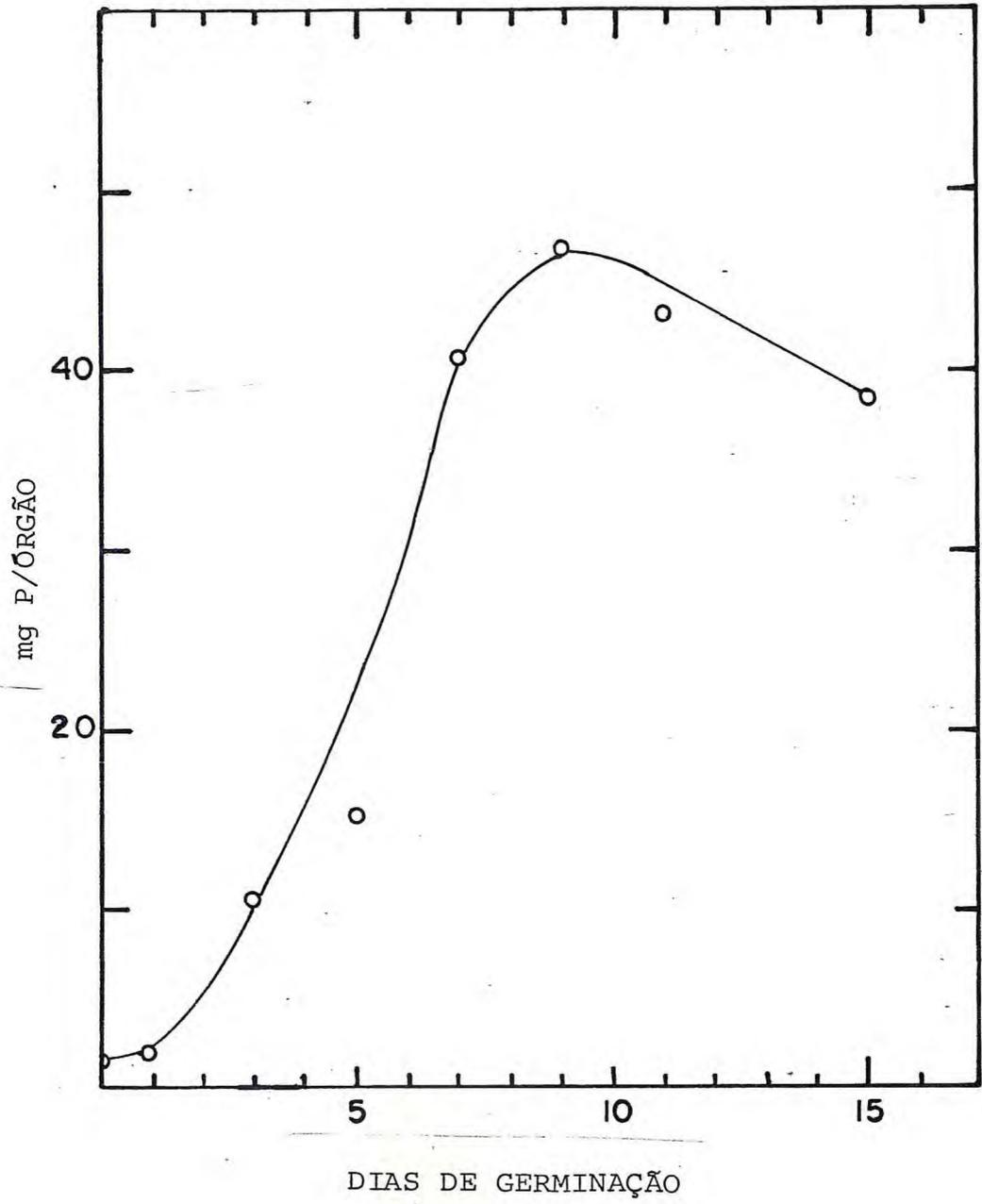


TABELA 9 - Teor de proteínas solúveis em eixos de *C. brasiliensis* ao longo da germinação

Eixos (dias)	mg proteína/órgão
0	1,70
1	1,90 ± 0,324
3	10,27 ± 0,320
5	15,25 ± 2,059
7	40,45 ± 0,895
9	46,62 ± 0,473
12	43,33 ± 4,245
15	38,44 ± 6,478

FIGURA 10 - Teor de proteínas de eixos de sementes quiescentes e de plântulas de *C. brasiliensis* ao longo da germinação.



3.6. Cromatografia de afinidade de extratos de cotilédones e eixos

Quando foram feitas cromatografias de afinidade em colunas de Sephadex G-50 de extratos de cotilédones de sementes quiescentes e de plântulas durante a germinação de *C. brasiliensis*, foram obtidos os resultados apresentados na Figura 11. A relação entre as proteínas de alto peso molecular (PI) e aquelas com atividade hemaglutinante (PIII) é apresentada na Figura 12.

Pelos dados obtidos nós podemos observar que tanto a fração PI (que encerra as proteínas de peso molecular maior que 30.000 daltons) como a fração PIII (que encerra as lectinas) decrescem durante a germinação, enquanto a fração PII (que encerra provavelmente peptídios pequenos) cresce continuamente.

Experimentos semelhantes foram realizados com eixos de sementes quiescentes e de plântulas obtidas em diversos tempos de germinação (Figura 13). É interessante ressaltar que não se observou, nestes experimentos, a presença da fração PIII.

3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS de extratos de cotilédones

Extratos totais obtidos de cotilédones de sementes quiescentes e de plântulas com diferentes tempos de germinação foram tratados com beta-mercaptoetanol 1% e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS. Os resultados obtidos (Figura 14) mostraram a presença de várias bandas de proteínas, variando na faixa de peso molecular compreendida entre 8.000 e 60.000 daltons, duas das quais (26.000 e 44.000 daltons) se destacam das demais. Enquanto a banda de 26.000 daltons se mantém ao longo da germinação, aquela de 44.000 daltons desaparece depois do 5º dia. Notou-se também o aparecimento de uma banda de forte intensidade com

Figura 11 - Cromatografia de afinidade de extratos de cotilédones de sementes quiescentes e de plântulas de *C. brasiliensis* em coluna de Sephadex G-50 equilibrada com NaCl 1 M contendo CaCl_2 5mM e MnCl_2 5mM, seguido de NaCl 1 M contendo CaCl_2 5mM, MnCl_2 5mM e glicose 0,1 M. Amostras: 14mg/1ml.

ABSORBÂNCIA (280 nm)

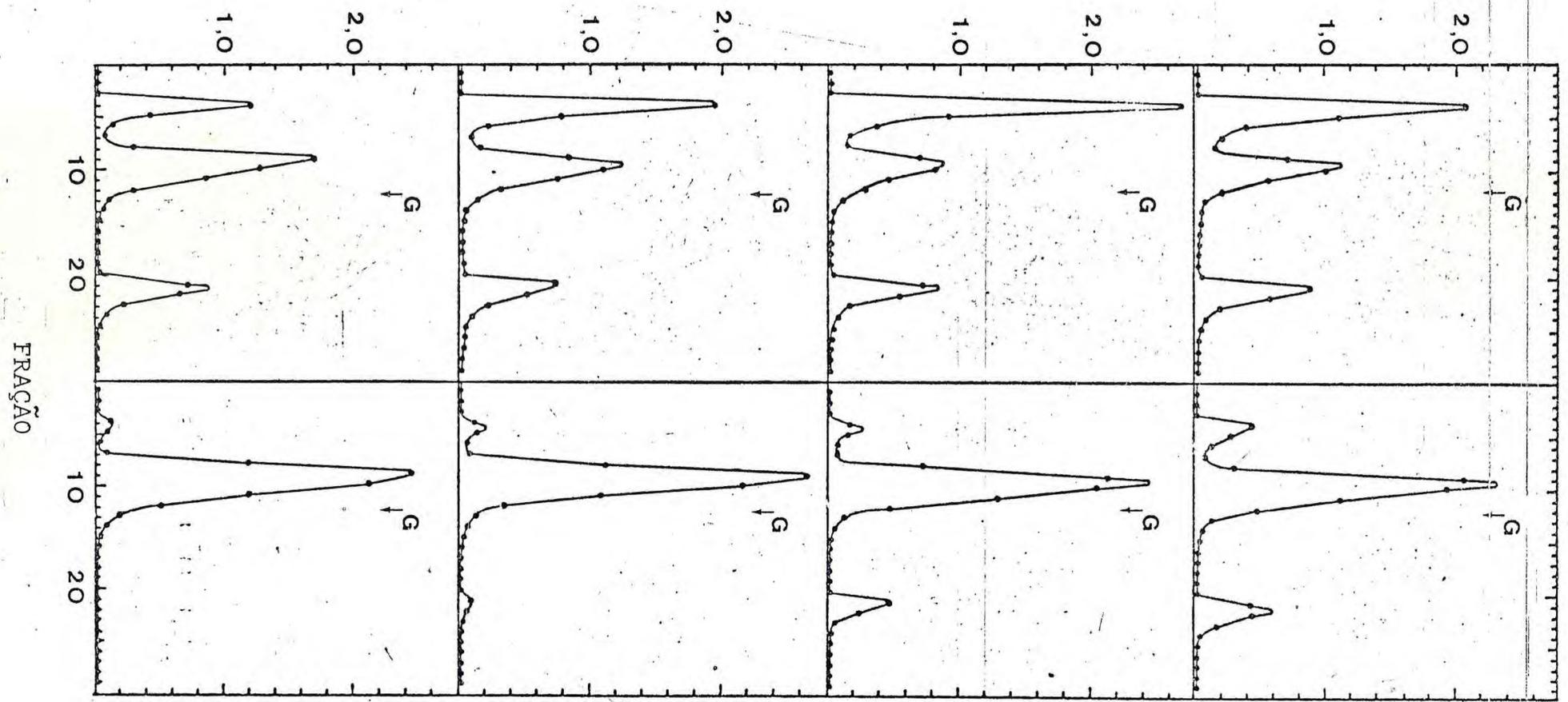


Figura 12 - Teor de proteínas nas frações PI (●—●—●) e PIII (○—○—○) obtidas por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 de cotilédones de sementes quiescentes e de plântulas ao longo da germinação. Os valores (%) são apresentados em relação ao teor encontrado em cotilédones de sementes quiescentes.

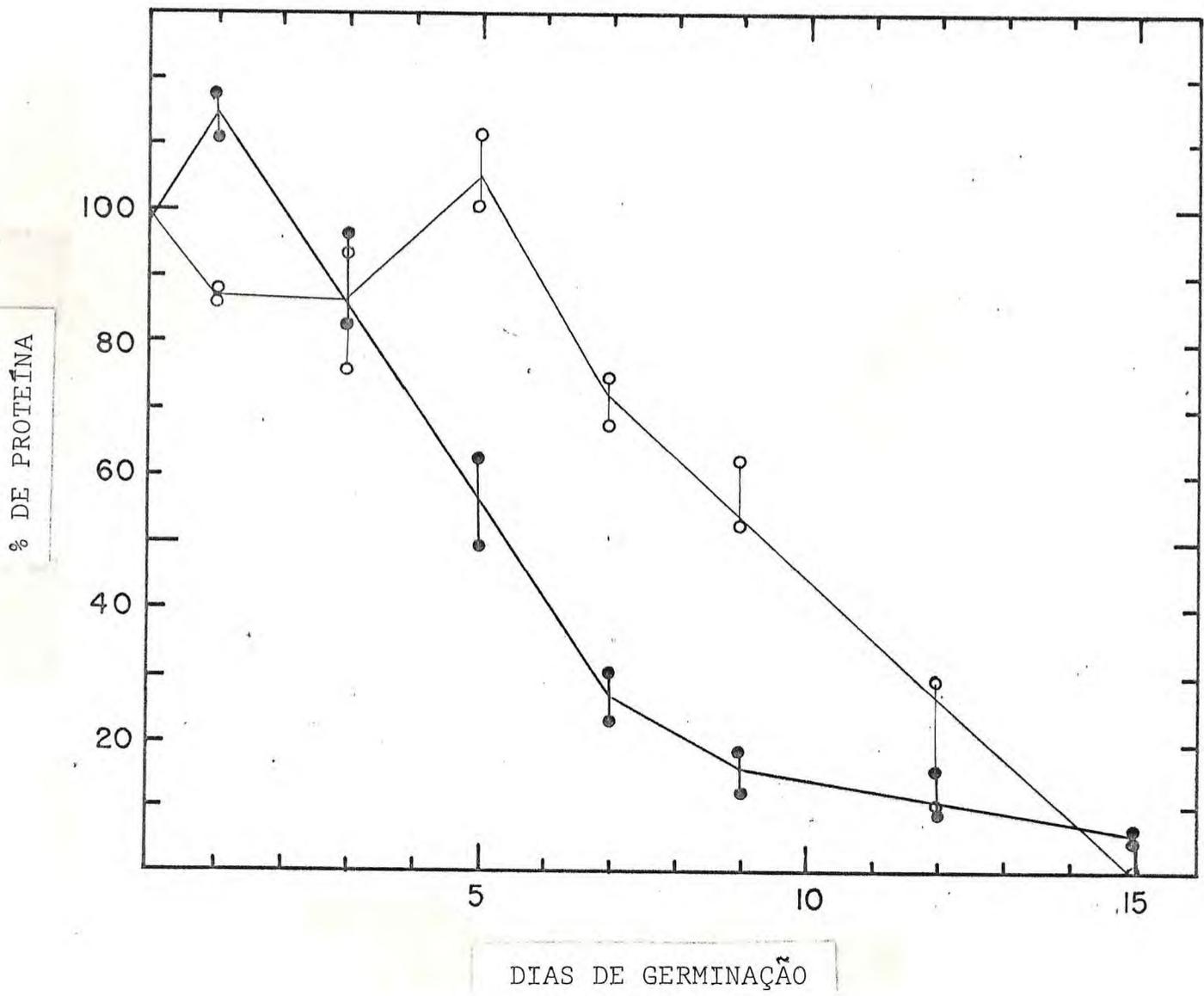


Figura 13 - Cromatografia de afinidade de extrato de eixos
sementes quiescentes e de plântulas de *C. b.*
liensis em coluna de Sephadex G-50 equilil
com NaCl 1 M contendo CaCl_2 5mM e MnCl_2 5mM,
guido de NaCl 1 M contendo CaCl_2 5mM, MnCl_2
glicose 0,1 M. Amostras: 10mg/1ml.

ABSORBÂNCIA (280 nm)

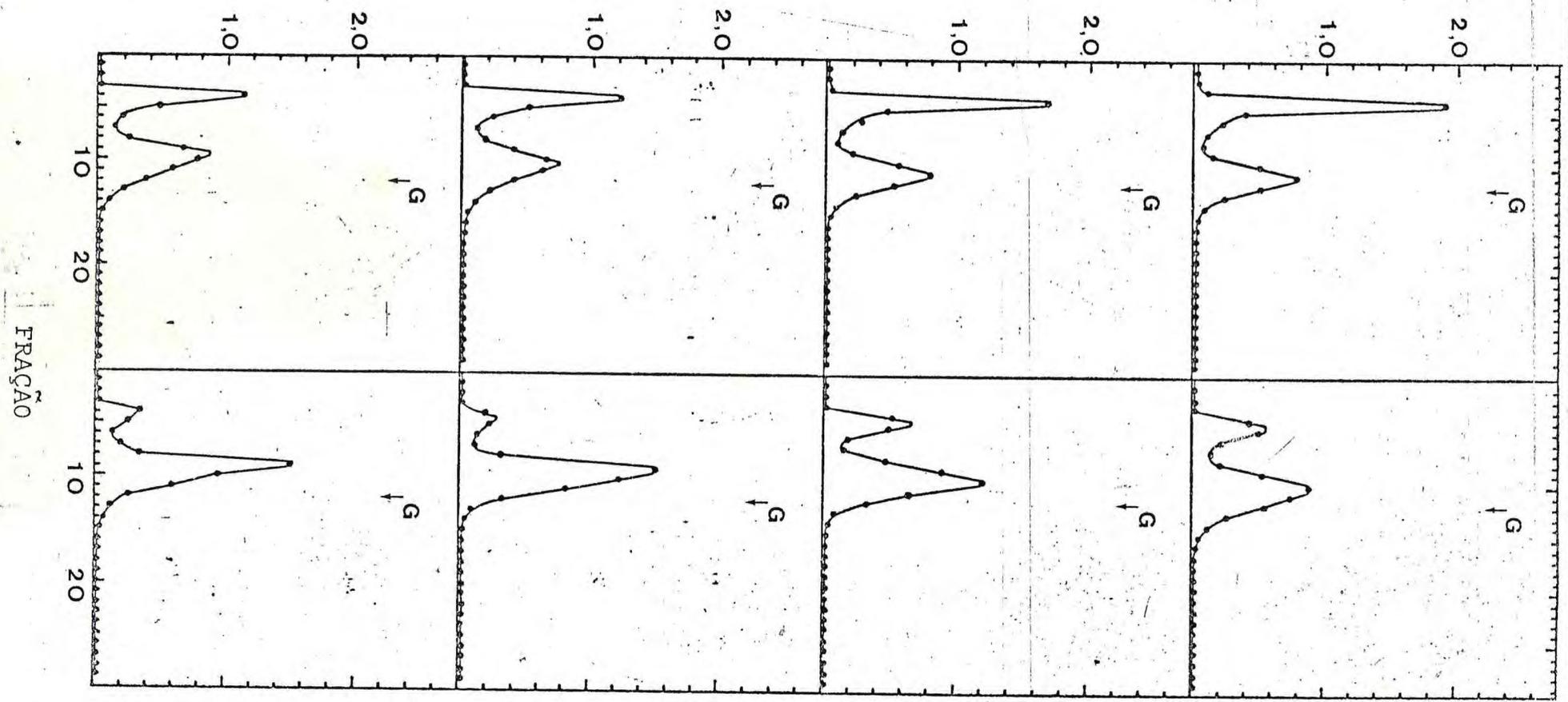
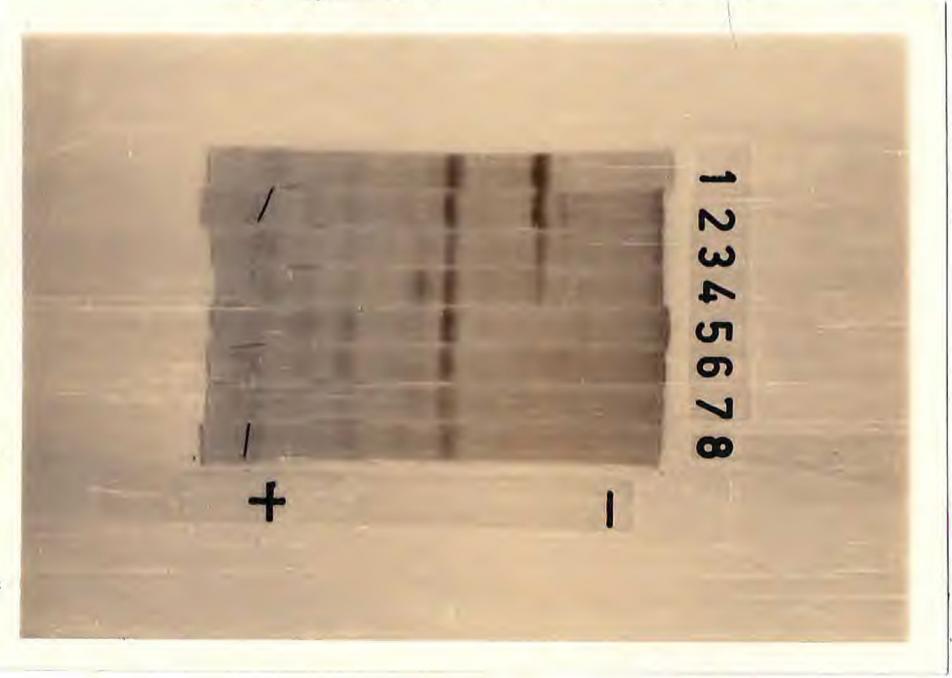


Figura 14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS de extrato de cotilédones de sementes quiescentes (1) e plântulas de 1 dia (2), 3 dias (3), 5 dias (4), 7 dias (5), 9 dias (6), 12 dias (7) e 15 dias (8), tratados com beta-mercaptoetanol.

PM X 10³
10 25 50



peso molecular de 23.000 daltons no 5º dia.

3.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS de extratos de eixos.

Extratos obtidos de eixos de plântulas com diferentes tempos de germinação foram tratados com beta-mercaptoetanol 1% e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS. Os resultados obtidos (Figura 15) mostraram a presença de várias bandas, notadamente na faixa de peso molecular entre 30.000 e 75.000 daltons. Foi notada também a ausência da banda de 26.000 daltons, característica das frações ativas.

3.9. Imunoeletroforese em gel de agarose de extratos de cotilédones

Quando foram feitas imunoeletroforeses em gel de agarose de extratos totais de cotilédones de sementes quiescentes e de plântulas com diferentes tempos de germinação, utilizando-se anti-soros preparados contra Extrato Total e fração PIII de sementes quiescentes, foram obtidos os resultados apresentados na Figura 16. Nota-se nos cotilédones de sementes quiescentes a presença de pelo menos 8 arcos reconhecidos pelo anti-soro contra Extrato Total, 3 dos quais responsáveis pela maior parte das proteínas e que diminuem sensivelmente de intensidade com a germinação. Por outro lado, percebe-se também a presença de 5 arcos reconhecidos pelo anti-soro contra a fração PIII, que praticamente se mantêm ao longo da germinação.

3.10. Imunoeletroforese em gel de agarose de extratos de eixos

Quando foram feitas imunoeletroforeses em gel de agarose em extratos totais de eixos de sementes quiescentes e de plântulas com diferentes dias de germinação, usando os mes-

Figura 15 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS de extrato de eixos de plântulas de 1 dia (1), 3 dias (2), 5 dias (3), 7 dias (4), 9 dias (5), 12 dias (6) e 15 dias (7), tratados com beta-mercaptoetanol.

1 2 3 4 5 6 7

PM X 10⁻³
50
25
10



Figura 16 - Imunoeletroforese em gel de agarose de extrato de cotilédones de sementes quiescentes (1) e plântulas de 1 dia (2), 3 dias (3), 5 dias (4), 7 dias (5), 9 dias (6), 12 dias (7) e 15 dias (8), contra anti-soros preparados contra Extrato Total (A) e contra a fração PIII (B). Amostras: 0,28mg.



mos anti-soros utilizados nos experimentos anteriores, foram obtidos os resultados apresentados na Figura 17. Nota-se nos extratos de eixos de sementes quiescentes a presença (de baixa intensidade) de pelo menos 6 arcos reconhecidos pelo anti-soro contra Extrato Total, que desaparecem quase por completo já no 3º dia de germinação. Quando se examina os resultados obtidos com anti-soro contra a fração PIII se nota apenas um arco extremamente fraco que desaparece após o 3º dia.

3.11. Imunoeletroforese em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total e fração PIII

Com a finalidade de se ter uma melhor identificação das frações ativas, foram feitos experimentos de imunoeletroforese das várias frações obtidas durante o isolamento das lectinas de *C. brasiliensis* em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total e fração PIII. Os resultados obtidos são mostrados nas figuras 18 e 19.

3.12. Imunoeletroforese de extratos de cotilédones e eixos em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total e fração PIII

Experimentos semelhantes foram feitos com extratos de cotilédones de sementes quiescentes e de plântulas com diferentes dias de germinação (Fig. 20 e 21). Notou-se que com o anti-soro preparado contra o Extrato Total o pico maior presente no Extrato Total (Fig. 20), e que corresponde ao pico maior na fração PI (Fig. 18), começa a desaparecer a partir do 9º dia, enquanto que picos menores, também presentes no Extrato Total, e que correspondem a fração PIII, se mantêm ao longo da germinação. Isto é confirmado quando experimentos semelhantes foram feitos com anti-soro preparado contra a fração PIII (Fig. 21).

Usando extratos de eixos de sementes quiescentes e de plântulas com diferentes dias de germinação, notou-se que, en

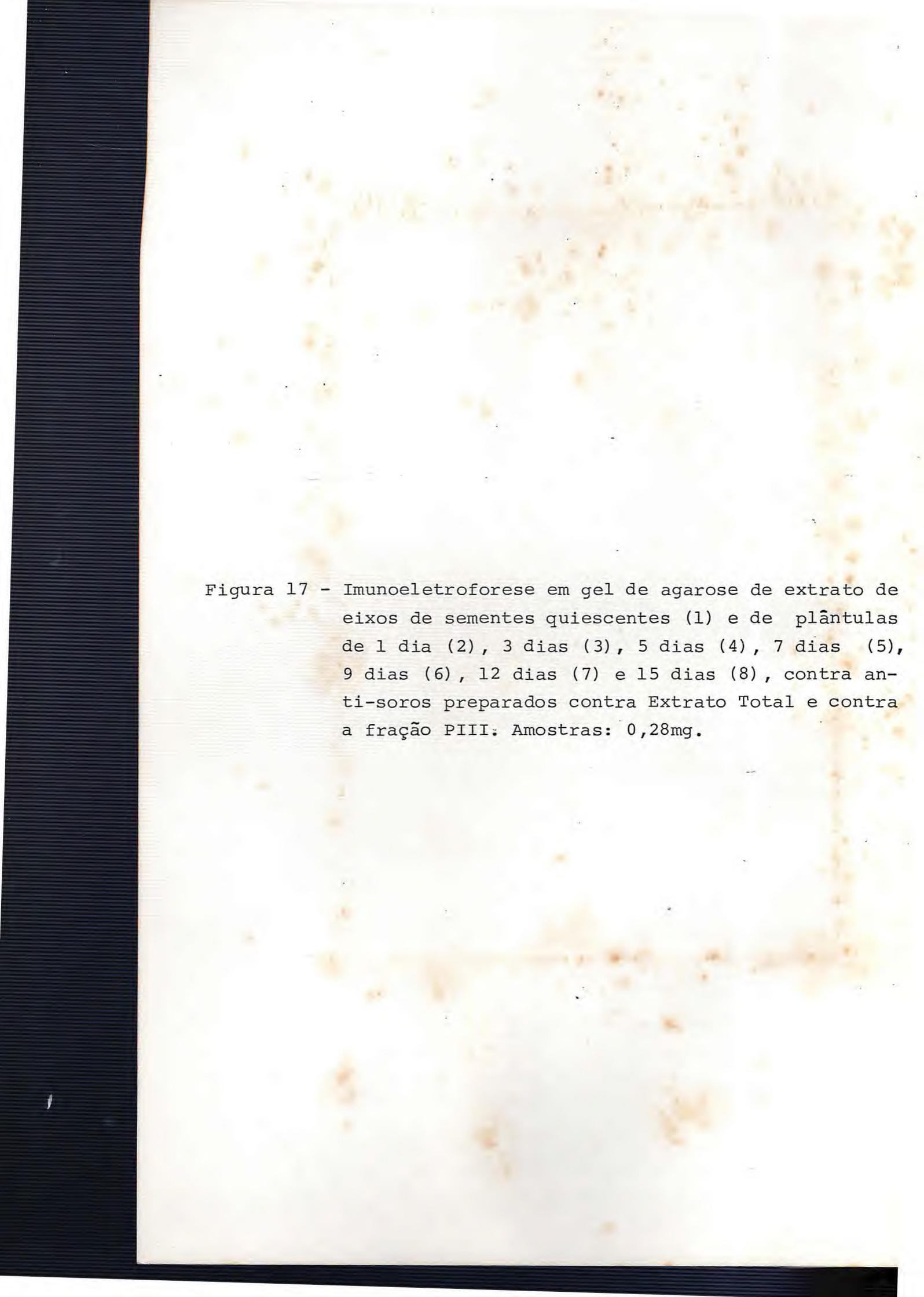


Figura 17 - Imunoelectroforese em gel de agarose de extrato de eixos de sementes quiescentes (1) e de plântulas de 1 dia (2), 3 dias (3), 5 dias (4), 7 dias (5), 9 dias (6), 12 dias (7) e 15 dias (8), contra anti-soros preparados contra Extrato Total e contra a fração PIII. Amostras: 0,28mg.

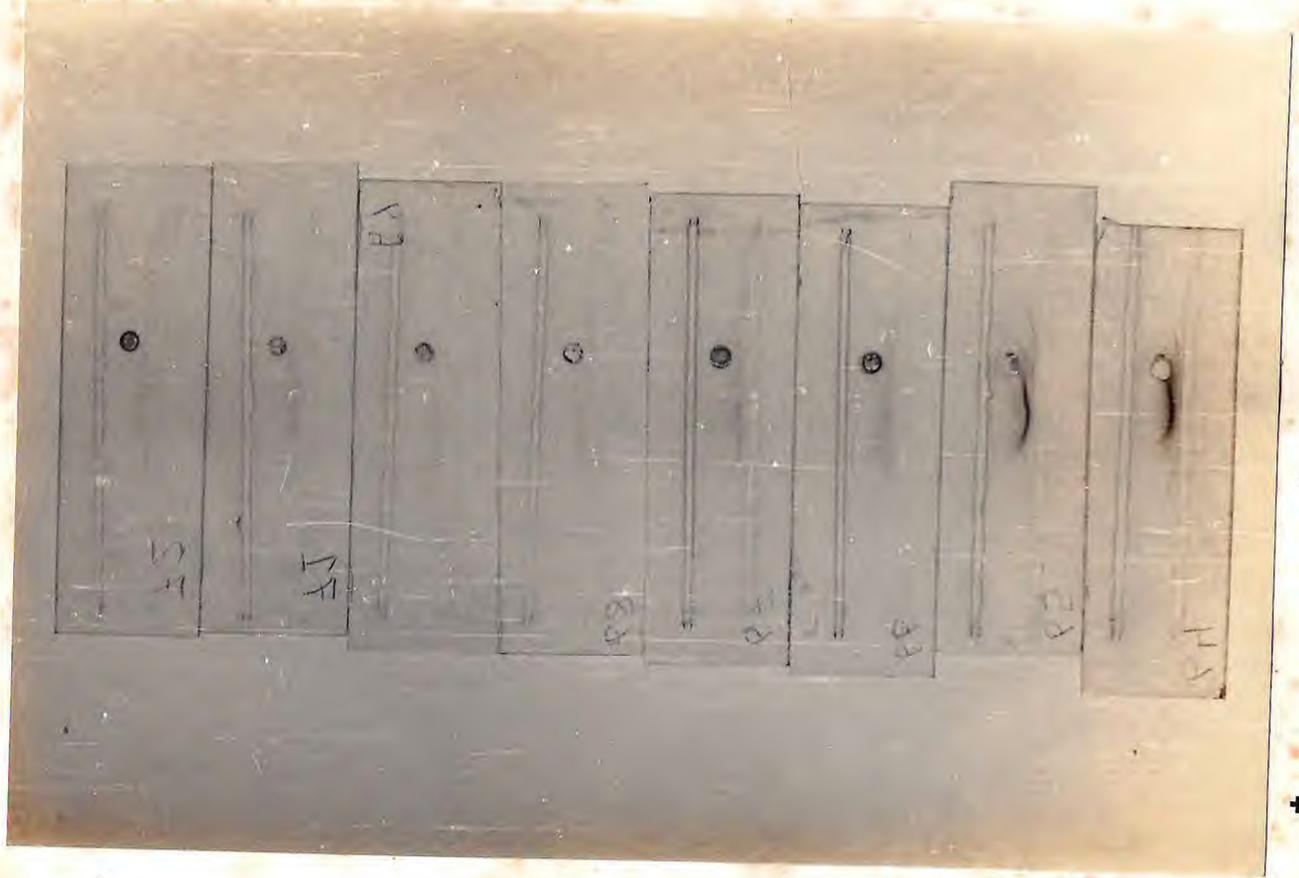


Figura 18 - Imunoeletroforese em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total. Amostras: Extrato Total (1), Globulinas (2), Albuminas (3), F 0/50 (4), F 50/90 (5), PI (6) e PIII (7). Amostras: 0,14mg.



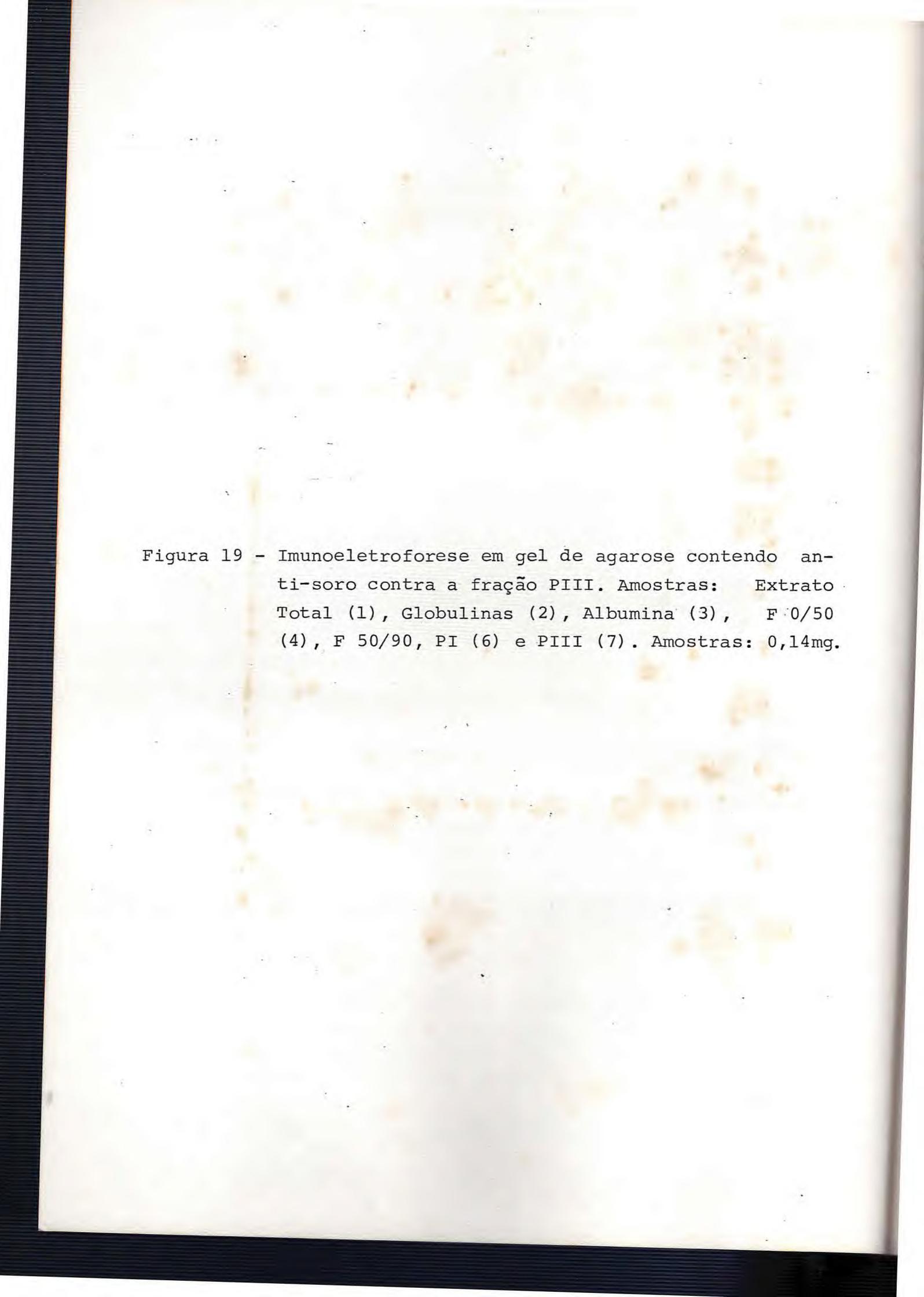


Figura 19 - Imunoeletroforese em gel de agarose contendo anti-soro contra a fração PIII. Amostras: Extrato Total (1), Globulinas (2), Albumina (3), F 0/50 (4), F 50/90, PI (6) e PIII (7). Amostras: 0,14mg.

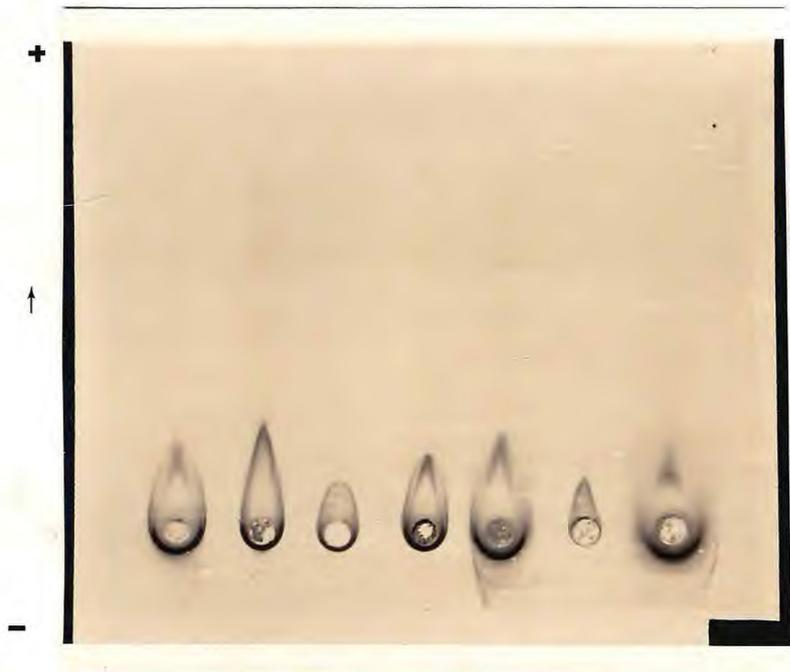


Figura 20 - Imunoeletroforese em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total. Amostras: cotilédones de sementes quiescentes (1) e de plântulas 1 dia (2), 3 dias (3), 5 dias (4), 7 dias (5), 9 dias (6), 12 dias (7) e 15 dias (8). Amostras: 0,14mg.



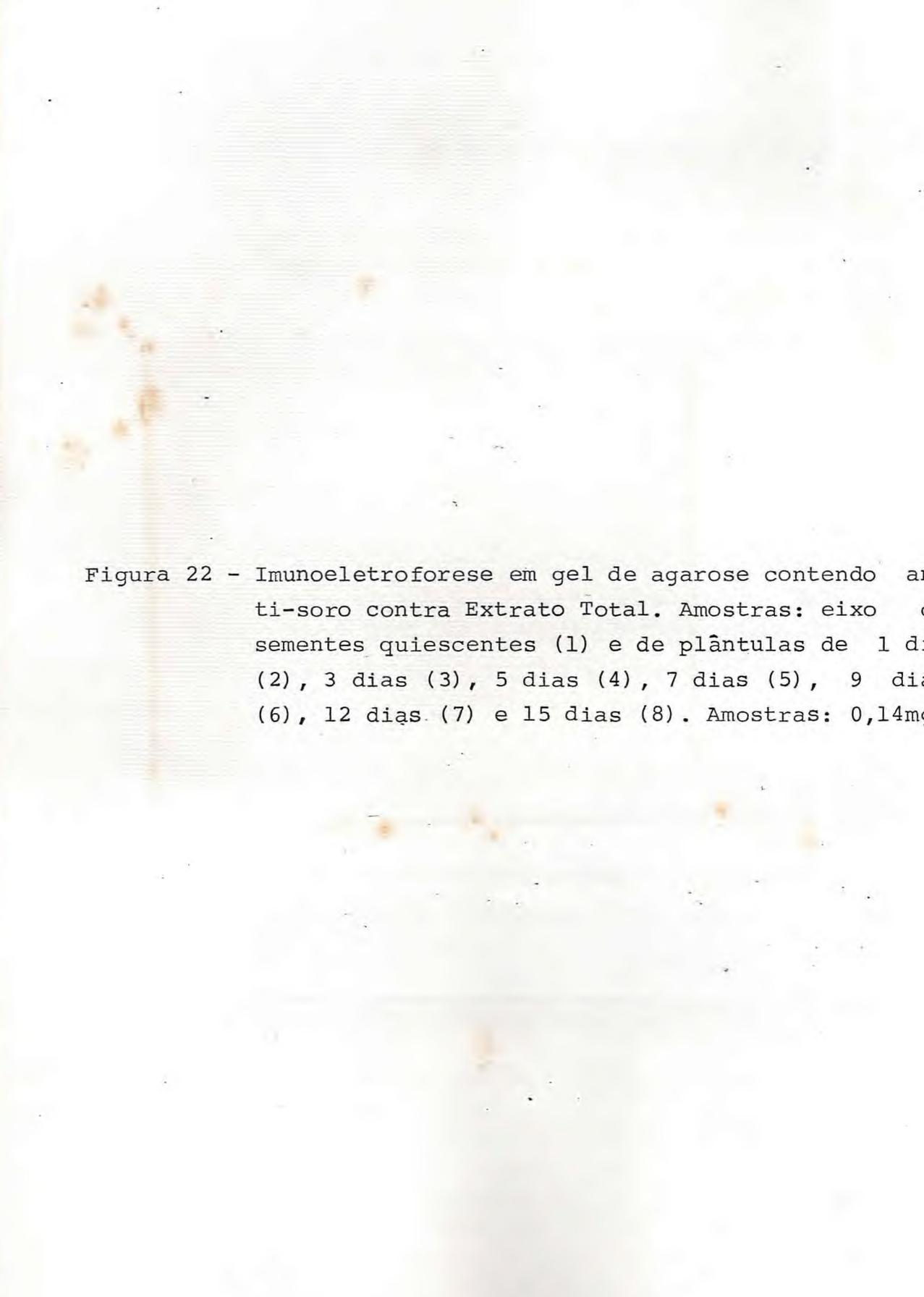
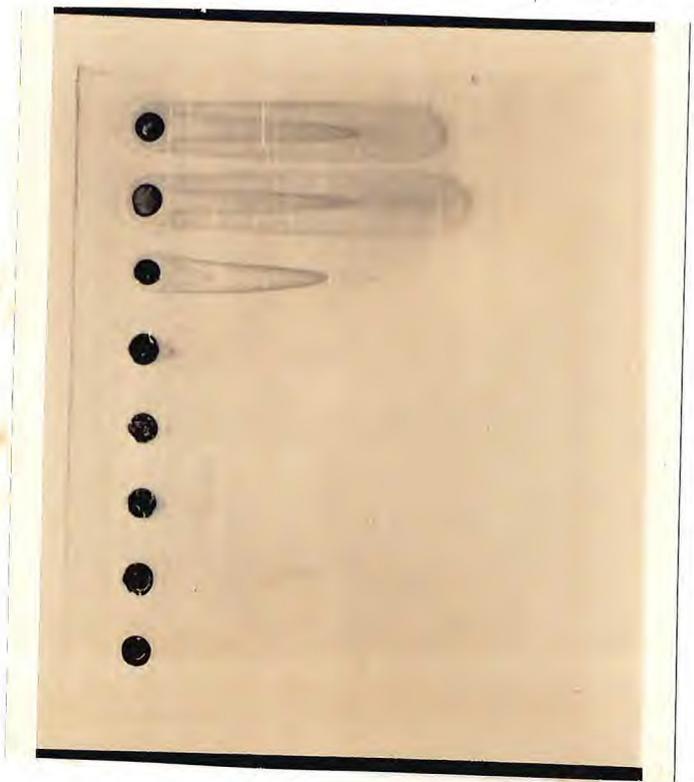
A imunoeletroforese em gel de agarose, embora o gel em si não seja visível, é descrita no texto. O experimento envolveu amostras de eixo de sementes quiescentes e plântulas em diferentes estágios de desenvolvimento (1 a 8 dias), testadas contra um anti-soro contra Extrato Total. Cada amostra foi aplicada em uma concentração de 0,14mg. O gel provavelmente mostrou bandas de precipitação que indicam a presença de antígenos específicos em cada amostra.

Figura 22 - Imunoeletroforese em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total. Amostras: eixo de sementes quiescentes (1) e de plântulas de 1 dia (2), 3 dias (3), 5 dias (4), 7 dias (5), 9 dias (6), 12 dias (7) e 15 dias (8). Amostras: 0,14mg.



quanto com o anti-soro contra o Extrato Total (Fig. 22) havia o aparecimento de picos fracos em extratos de eixos de sementes quiescentes e que desaparecem após o 5º dia, contra o anti-soro preparado contra a fração PIII não houve o aparecimento de qualquer pico.

3.13. Imunoelectroforese bidimensional em gel de agarose

Quando foram feitos experimentos de imunoelectroforese bidimensional com extratos de cotilédones de sementes quiescentes e de plântulas com diferentes dias de germinação, em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total, foram obtidos os resultados apresentados nas Figuras 23 a 30.

Dos resultados obtidos foi notado a presença de pelo menos 9 picos nos extratos de cotilédones de sementes quiescentes, alguns dos quais desaparecem já nos primeiros dias de germinação, enquanto que outros se mantêm até o 15º dia. Deve ser aqui ressaltado a presença de um pico difuso que parece ser característico da lectina.

Figura 21 - Imunoeletroforese em gel de agarose contendo anti-soro contra a fração PIII. Amostras: cotilédones de sementes quiescentes (1) e de plântulas de 1 dia (2), 3 dias (3), 5 dias (4), 7 dias (5), 9 dias (6), 12 dias (7) e 15 dias (8). Amostras: 0,14mg.

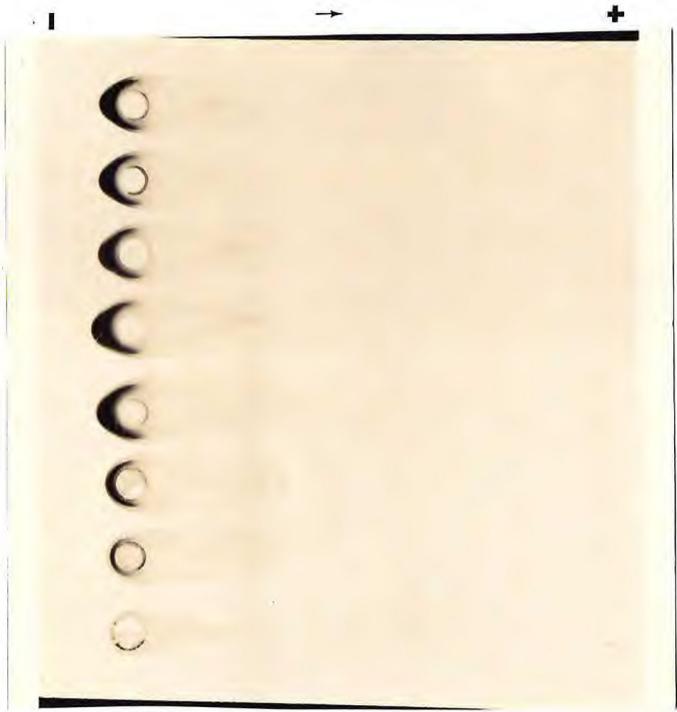


Figura 23 - Imunoeletroforese bidimensional em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total de extrato de cotilédones de sementes quiescentes. Amostras: 0,2mg.



Figura 24 - Imunoeletroforese bidimensional em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total de extrato de cotilédones de plântulas de 1 dia. Amostras: 0,2mg.



Figura 25 - Imunoeletroforese bidimensional em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total de extrato de cotilédones de plântulas de 3 dias. Amostras: 0,2mg.



Figura 26 - Imunoeletroforese bidimensional em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total de extrato de cotilédones de plântulas de 5 dias. Amostras: 0,2mg.



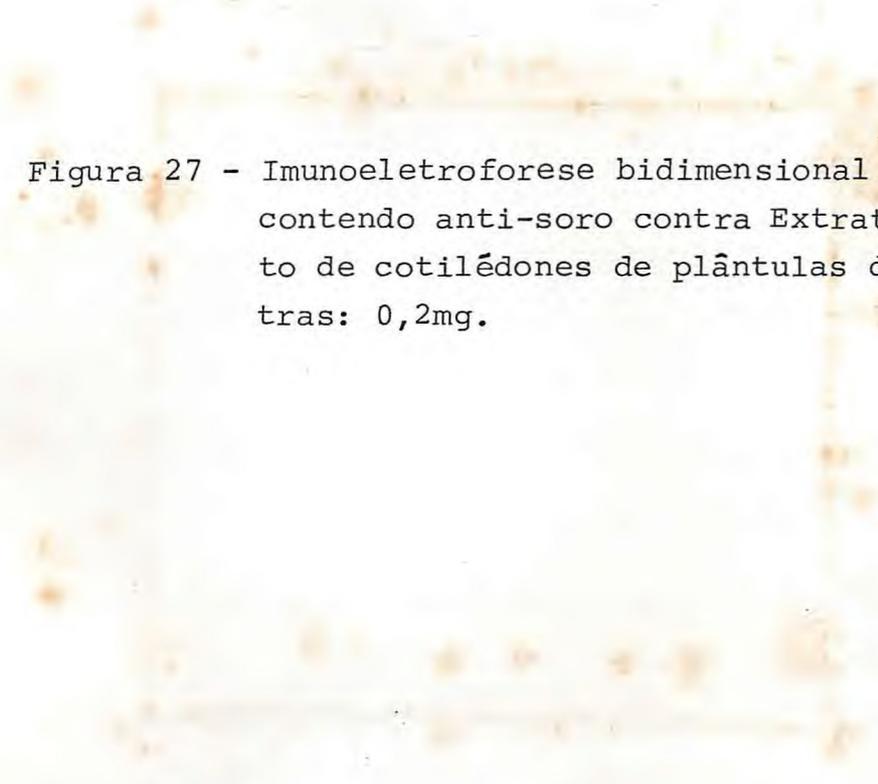


Figura 27 - Imunoeletroforese bidimensional em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total de extrato de cotilédones de plântulas de 7 dias. Amostras: 0,2mg.



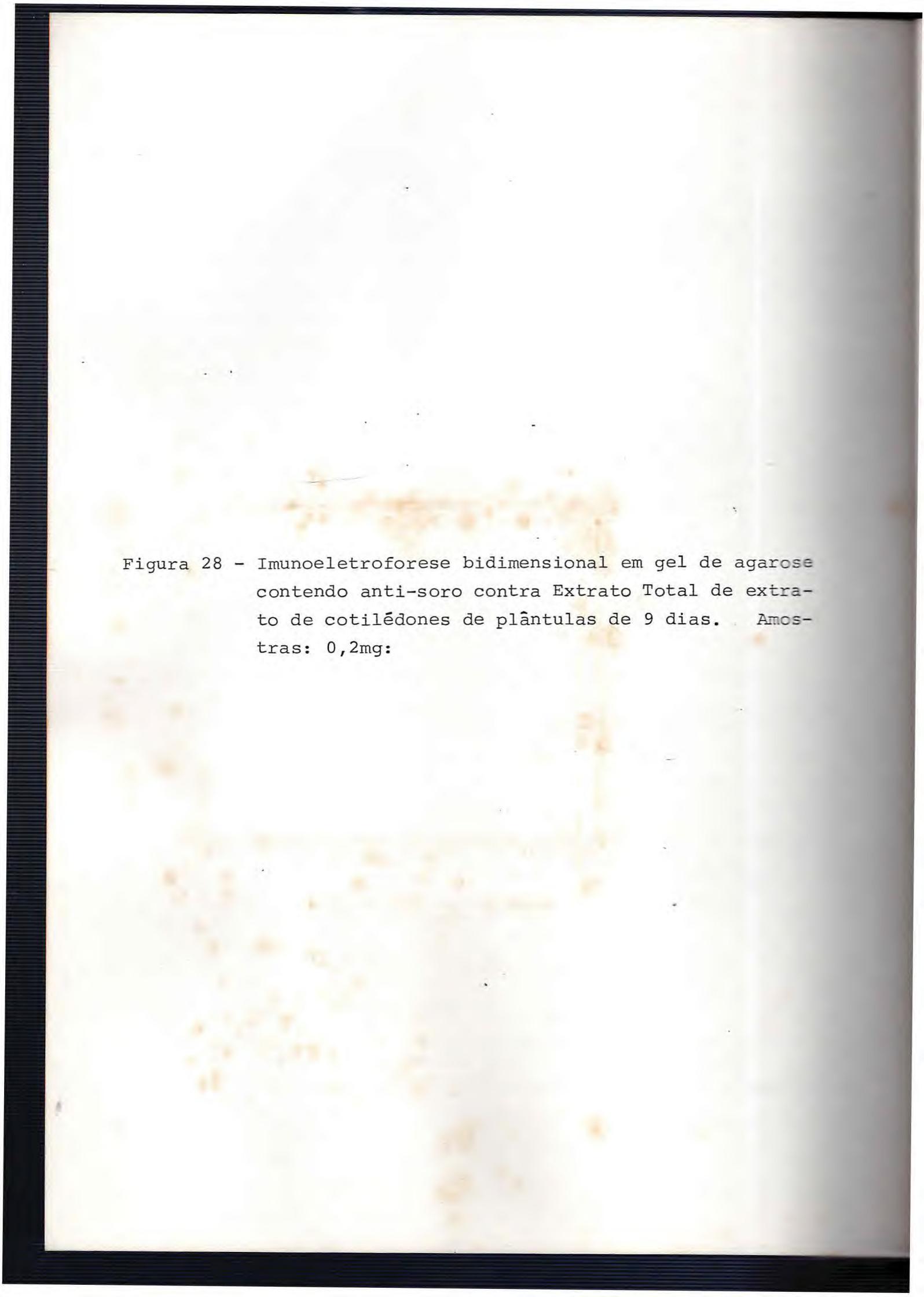


Figura 28 - Imunoelectroforese bidimensional em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total de extrato de cotilédones de plântulas de 9 dias. Amostras: 0,2mg:



Figura 29 - Imunoeletroforese bidimensional em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total de extrato de cotilédones de plântulas de 12 dias. Amostras: 0,2mg.



Figura 30 - Imunoeletroforese bidimensional em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total de extrato de cotilédones de plântulas de 15 dias. Amostras: 0,2mg.



IV. DISCUSSÃO

A fração globulínica do extrato de sementes de *C. brasiliensis* encerra a quase totalidade das lectinas e das demais proteínas, enquanto somente 3,5% da proteína não dialisável e 5,2% da atividade total encontram-se na fração albumínica. Por outro lado, quando o Extrato Total é fracionado por precipitação com sulfato de amônio, 89% da atividade é retida na fração F 50/90. A atividade hemaglutinante é estimulada pela presença de Ca^{++} e Mn^{++} e inibida por glicose e mais fracamente por manose e frutose. De uma maneira geral esses dados são concordantes com aqueles encontrados na literatura para a Concanavalina A (12).

Do mesmo modo que a Con A, as lectinas de *C. brasiliensis* também mostram afinidade por Sephadex, podendo, portanto, serem fracionadas por cromatografia de afinidade em coluna deste polímero de dextrana. A fração retida PIII (tratada com ácido acético) apresentou uma purificação de 39,4 vezes com relação ao Extrato Total.

A atividade hemaglutinante total aparentemente aumentou durante todo o processo de fracionamento (Tabela 3). Este aumento é devido, provavelmente, à eliminação de inibidores de atividade hemaglutinante presentes quer no Extrato Total, quer nas frações subseqüentes. Entre esses inibidores devemos destacar não só açúcares livres, como amido. A presença de substâncias que inibem a hemaglutinação foi mais notada quando foi feita extração da farinha com NaCl 0,15 M contendo Ca^{++} e Mn^{++} .

Os dados aqui apresentados não estão em concordância com aqueles encontrados por Gomes (25) para a atividade hemaglutinante pois ele encontrou que a totalidade da mesma precipitava entre 35 e 50% de saturação de sulfato de amônio e não

estabeleceu a necessidade de Ca^{++} e Mn^{++} .

Por eletroforese das diversas frações obtidas no isolamento em gel de poliacrilamida contendo SDS foi notada a presença de até 15 bandas, 4 das quais (pesos moleculares de 8.000, 13.000, 23.000 e 26.000 daltons), características da fração PIII, estão presentes em todas as frações ativas, destacando-se em intensidade a banda de peso molecular de 26.000 daltons. Esta banda corresponde provavelmente as lectinas, sendo as outras 3 aparentemente contaminantes.

Quando estas mesmas amostras, tratadas previamente com beta-mercaptoetanol, foram submetidas ao mesmo tipo de experimento, apresentaram poucas diferenças quanto ao tipo de bandas, sendo notado apenas que determinadas bandas com peso molecular acima de 50.000 daltons desaparecem, notadamente nas frações albumínicas e F 50/90.

A fração PIII apresentou um espectro de absorção característico de proteínas com elevado teor de aminoácidos aromáticos, com um máximo de absorção a 280nm. O coeficiente de extinção encontrado para a fração PIII ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 13,52$) é da mesma ordem do citado na literatura para a Con A (12).

As sementes de *C. brasiliensis* se mostraram incapazes de germinar sem sofrer um tratamento prévio com ácido sulfúrico concentrado por 50 minutos. A dormência dessas sementes se deve provavelmente à impermeabilidade à água e/ou resistência mecânica do tegumento, precisando o mesmo ser escarificado pelo ácido sulfúrico para que a semente sofra embebição, desencadeando com isso o processo germinativo.

O acréscimo de peso fresco dos cotilédones até o 5º dia de germinação, provavelmente, se deve à absorção de água e o decréscimo subsequente e contínuo ao longo da germinação se deve à degradação de suas reservas para a síntese de tecidos da plântula, cujo eixo cresce em peso fresco continuamente com a germinação.

O peso seco dos cotilédones decresce durante todo o

processo, apresentando um comportamento bastante semelhante ao observado para o teor de proteínas e a atividade hemaglutinante durante todo o período estudado, enquanto que o peso seco dos eixos cresce constantemente, devido à translocação das reservas cotiledonárias para o mesmo. Foi notado também que o peso total (2 cotilédones + eixo) decresce continuamente durante a germinação, atingindo até o 15º dia um valor que corresponde a 67,7% do valor inicial. Esta diminuição de peso se deve provavelmente a perdas durante o metabolismo de energia da planta.

O comportamento encontrado para as proteínas solúveis ao longo da germinação foi característico, com um decréscimo constante das proteínas cotiledonárias e um aumento das proteínas do eixo até o 9º dia, seguido de um decréscimo lento até o 15º dia. Este comportamento pode ser explicado por uma mobilização de proteínas dos cotilédones para o eixo até o 9º dia, quando os cotilédones estão praticamente exauridos; o decréscimo subsequente no eixo se deve, provavelmente, a imobilização de proteínas solúveis como proteínas estruturais.

Não foi detectada atividade hemaglutinante nos extratos de eixo durante todo o período estudado. Nos cotilédones esta atividade sofre um rápido acréscimo no primeiro dia, devido provavelmente à eliminação de inibidores ou liberação de ativadores. A seguir, a atividade decresce continuamente com a germinação, apresentando um comportamento muito semelhante ao das proteínas cotiledonárias. Esses últimos resultados estão de acordo com os obtidos por Rougé (57), levando-se a acreditar na possibilidade de haver uma mobilização paralela dessas proteínas.

Quando se observou o comportamento das proteínas ao longo da germinação por cromatografia em Sephadex G-50 de extratos tanto de cotilédones como de eixos, foi notado que em ambos há uma diminuição sensível da fração PI de peso molecular elevado (acima de 35.000 daltons) e um aumento paralelo da fração PII de peso molecular baixo (abaixo de 5.000 daltons) ao longo da germinação. Este aumento de PII parece ser

devido à degradação das proteínas de peso molecular elevado.

Ao se examinar o comportamento das lectinas através da sua afinidade pela coluna de Sephadex G-50, dado pela quantidade de proteína retida (fração PIII) foi verificado durante todo o período investigado a ausência completa de lectinas nos extratos de eixos. Nos cotilédones (Fig. 11 e 12), por outro lado, foi notado que embora houvesse mobilização ao longo da germinação, esta não acompanhava a mobilização das proteínas de peso molecular elevado (PI). O aparente desacordo entre este comportamento e o paralelismo encontrado entre o teor de proteína e a atividade hemaglutinante ao longo da germinação (Fig. 9) pode ser explicado lembrando-se que nestes experimentos o teor de proteínas foi determinado pelo método de microbiureto que revela ao mesmo tempo tanto PI como PII, não deixando aparecer a mobilização $PI \rightarrow PII$.

Esta hipótese de um comportamento diferenciado é confirmada pelos experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e beta-mercaptoetanol, dos extratos de cotilédones, onde se nota ao longo da germinação o desaparecimento da principal banda de peso molecular elevado (44.000 daltons) característica da fração PI, enquanto aquela banda característica da fração PIII (26.000 daltons) permanece até o fim do período estudado, dando assim uma forte indicação de que as lectinas são conservadas, pelo menos nas suas estruturas monoméricas, até o 15º dia de germinação.

Em experimentos semelhantes feitos com extratos de eixos foi notada a ausência de bandas características das frações ativas, confirmando a ausência de lectinas nos mesmos.

Quando se examina os resultados obtidos por imunoeletroforese em gel de agarose (Figura 16), em cotilédones de sementes quiescentes e de plântulas com diferentes dias, podem ser notados dois grupos de arcos, um deles de baixa mobilidade que quase não sai da origem, que é reconhecido tanto pelo anti-soro contra Extrato Total como pelo anti-soro contra a fração PIII e um segundo grupo, no qual se destaca um arco

forte, que é reconhecido apenas pelo anti-soro contra o Extrato Total. Durante a germinação pode ser notado que este arco desaparece depois de nove dias enquanto que o grupo reconhecido pelos dois anti-soros permanece presente.

Esta interpretação pode ser confirmada pelos experimentos de imunoeletroforese em gel de agarose contendo anti-soro (Fig. 20 e 21) onde se nota que os picos de maior intensidade (comparar com a Fig. 18) correspondem à fração PI e as bandas de menor intensidade e difusas correspondem à fração PIII (ver Fig. 19). Pelas figuras 20 e 21 podemos ver que as proteínas correspondendo à fração PI desaparecem depois do 9º dia enquanto que aquelas correspondentes à fração PIII permanecem sem alteração até o 12º, diminuindo apenas no 15º dia.

Os experimentos realizados com extratos de eixos, tanto de imunoeletroforese em gel de agarose (Fig. 17) como de imunoeletroforese em gel de agarose contendo anti-soro contra Extrato Total (Fig. 20), apresentam bandas correspondentes à fração PI, que desaparecem após o 5º dia.

As Fig. 23 a 30 parecem confirmar as especulações acima. A fração PI parece ser responsável pelo pico maior, que se apresenta com uma intensidade elevada tanto nos experimentos de imunoeletroforese bidimensional como nos experimentos de imunoeletroforese em gel de agarose contendo anti-soro, diminui sensivelmente de intensidade depois do 9º dia. A fração PIII, por sua vez, que parece ser responsável por aqueles picos difusos de mobilidade pequena e baixa intensidade, encontrados nestes mesmos experimentos, permanece presente até o fim do período estudado.

Examinando o conjunto de experimentos podemos ver que embora as lectinas já estejam solúveis na semente quiescente, aparentemente parte das mesmas ou estão inibidas ou não estão com a estrutura quaternária estabelecida, pois embora sejam capazes de se prender à coluna de Sephadex G-50, o que requer apenas 1 sítio de ligação, não são capazes de aglutinar hemácias (2 sítios de ligação). Nas primeiras horas após o início

do processo germinativo, com a diminuição dos inibidores ou aparecimento das condições ideais para a formação da estrutura quaternária, a atividade plena das lectinas é estabelecida. A partir de então há provavelmente um desarranjo na estrutura quaternária com uma diminuição da capacidade de aglutinar hemácias, mantendo-se, porém, por mais tempo, a capacidade de se ligar à coluna de Sephadex, indicando a presença pelo menos das subunidades monoméricas (eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS) e os grupamentos antigênicos (experimentos imunoquímicos).

V. CONCLUSÕES

1. As lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis* podem ser isoladas por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50, requerem Ca^{++} e Mn^{++} para apresentarem atividade hemaglutinante e são inibidas por glicose, frutose e mamose.

2. A atividade hemaglutinante das lectinas de *C. brasiliensis* se concentra principalmente na fração do Extrato Total que precipita entre 50 e 90% de saturação de sulfato de amônio.

3. Em cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 praticamente toda a atividade hemaglutinante se concentra na fração retida.

4. Experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida demonstram a presença de quatro bandas em todas as frações ativas de *C. brasiliensis*, com pesos moleculares de 8.000, 13.000, 23.000 e 26.000 daltons, destacando-se aquela de peso molecular de 26.000 daltons.

5. As sementes de *C. brasiliensis* só germinam mediante tratamento prévio para quebrar a dormência.

6. O comportamento de peso seco, do teor de proteínas solúveis e da atividade hemaglutinante nos cotilédones no decorrer da germinação mostraram-se paralelos.

7. Durante todo o período estudado o teor de proteínas solúveis nos eixos cresceu continuamente, enquanto que a atividade hemaglutinante não foi detectada nos mesmos.

8. No decorrer da germinação de *C. brasiliensis* as lecti-

nas são mobilizadas mais tardiamente que as demais proteínas de alto peso molecular.

9. Não foi detectada a presença de proteínas apresentando afinidade por coluna de Sephadex G-50 em extratos de eixos, em nenhum momento da germinação, bem como não foi encontrado nos mesmos bandas com PM de 26.000 daltons, características das frações ativas.

10. As bandas de peso molecular de 26.000 daltons, características das frações ativas de *C. brasiliensis*, são mobilizadas mais tardiamente que as demais proteínas de peso molecular elevado.

11. Experimentos imunológicos mostraram haver mobilização dos arcos das frações ativas mais tardiamente do que as demais proteínas sem atividade.

12. Durante a germinação de sementes de *C. brasiliensis*, há provavelmente uma ativação inicial das lectinas seguida de uma desorganização da estrutura quaternária, que se reflete primeiro na atividade hemaglutinante e depois na afinidade por dextrana, mas conservando-se até mais tarde pelo menos as formas monoméricas.

VI. BIBLIOGRAFIA

- (1) ALBERSHEIM, P. and ANDERSON, A.J. (1971). Proteins from plant cell walls inhibit polygalacturonases secreted by plant pathogens. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 68(8): 1815-1819.
- (2) ALLEN, A.K. and NEUBERGER, A. (1973). J. Biochem. 135:307, citado em 24.
- (3) AGRAWAL, B.B.L. and GOLDSTEIN, I.J. (1972), Concanavalin A, the jack bean (Canavalia ensiformis) phytohemagglutinin, Meth. Enzymol., 28:313-318.
- (4) AUB, J.C., TIESLAU, C. and LANKESTER, A. (1965). Proc. Nat. Acad. Sci. US, 50:613-619, citado em 20.
- (5) AXELSEN, N.H., KROLL, J. and WEEKE, B. (1977), A manual of quantitative immuno-electrophoresis, methods and applications. Black-Well Scientific Publications, Oxford, 169pp.
- (6) BAILEY, J.L. (1967). Techniques in Protein Chemistry . 2nd. Ed., New York, revised and expanded edition, Elsevier Publishing Co., 406pp.
- (7) BAKER, P.R.W. (1961), The microkjeldahl determination of nitrogen. Talanta, 8:57-70.
- (8) BANGERTH, F., GÖTZ, G. and BUCHLOH, G. (1972). Effects of phytohemagglutinin sprays upon parthenocarpic fruit set of the barlett pear (William's) and a male sterile mutant fo the tomato. Z. Pflanzenphysiol. 66 S. 375-377.
- (9) BHUVANESWARI, T.V., PUEPPKE, S.G., BAUER, W.D. (1977). Role of lectins in plant-microorganism interactions II. Binding of soybean lectin to Rhizobia. Plant Physiol. 60:486-491.

- (10) BIDDLE, F., CRONIN, A.P. and SANDERS, F.K. (1970). The interaction between wheat germ agglutinin and receptors on normal and transformed cells and on erythrocytes. Cytobios, 5:9-17.
- (11) BIRD, G.W.G. (1959). Haemagglutinins in Seeds, Brit. Med. Bull. 15, citado por 42.
- (12) BITTIGER, H. and SCHNEBLI, H.P., (1976). Concanavalin A as a tool, John Wiley & Sons, London, 639pp.
- (13) BOHLOOL, B.B. and SCHMIDT, E.L. (1974) Lectins: a possible basis for specificity in the *Rhizobium*-legume root nodule symbiosis. Science, 185(4147):269-271.
- (14) BORBERG, H., WOODDRUFF, J., HIRSCHHORN, R., GESNER, B., MIESCHER, P. and SILBER, R. (1966): Phytohemagglutinin: inhibition of the agglutinating activity by N-acetyl-D-galactosamine. Science, 154:1019-1020.
- (15) BOWLES, D.J. and KAUSS, H. (1975). Pl. Sci. Lett., 4:411-418.
- (16) BOYD, W.C. (1963). The lectins: Their present status. Vox Sang., 8:1-32.
- (17) BOYD, W.C. and BLAKESLEE, A.F. (1954). Unpublished observations, citado em 16.
- (18) CHIN, J.C. and SCOTT, K.J. (1979). Effect of phytolectins on isolated protoplasts from plants. Ann. Bot. 43:33-44.
- (19) CLAUSEN, J. (1969). Immunochemical techniques for the identification of macromolecules, in T.S. WORK and E. WORK - Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 1, North-Holland Publishing Company, Amsterdam-London, 572pp.
- (20) COOK, G.M.W. and STODDART, R.W. (1973). Surface Carbohydrates of the Eukaryotic Cell. Academic Press, London, 346pp.

- (21) DAZZO, F.B. and BRILL, W.J. (1978). Regulation by fixed nitrogen of host-symbiont recognition in the *Rhizobium*-clover symbiosis. Plant Physiol, 62:18-21.
- (22) DETERMAN, H. Gel Chromatography (1969). Springer-Verlag, 2 nd., New York, 202pp.
- (23) FONT, J., LESENEY, A.M. et BOURRILLON, R. (1971). Isolement et propriétés d'une phytohémagglutinine anti A₁ extraite des graines de *Dolichos biflorus*, Biochem. Biophys. Acta, 243:434-446.
- (24) GOLD, E.R. and BALDING, P. (1975). Receptor Specific Proteins: Plant and Animal Lectins. Excerpta Medica, Amsterdam, 440pp.
- (25) GÓMEZ, G.P. (1976). Estudio preliminar de la fito-hemoaglutinina de la *Canavalia brasiliensis*. Rev. Col. de Quím., 6:13-26.
- (26) HANKINS, C.N., KINDINGER, J.I. and SHANNON, L.M. (1979). Legume lectins I. Immunological cross-reactions between the enzymic lectin from mung beans and other well characterized legume lectins. Plant Physiol., 64:104-107.
- (27) HAMBLIN, J. and KENT, S.P. (1973). Possible role of phytohemagglutinin in *Phaseolus vulgaris* L. Nat., 245: 28-30.
- (28) HILLER, A., PLAZIN, J. and SLYKE, D.V. (1948). A study of conditions for Kjeldahl determination of nitrogen in proteins. J. Biol. Chem., 176:1401-1420.
- (29) HOLLAND, N.H. and HOLLAND, P. (1965). Haemagglutinating, precipitating and lymphocyte-stimulating factors of phytohaemagglutinin, Nat., 207:1307-1308.
- (30) HOWARD, J., KINDINGER, J. and SHANNON, L.M. (1979). Conservation of antigenic determinants among different seed lectins. Arch. of Biochem. Biophys., 192(2):457-465.

- (31) HOWARD, I.K., SAGE, H.J. and HORTON, C.B. (1972).
Communication: Studies on the appearance and location
of hemagglutinins from a common lentil during the
life cycle of the plant Arch. of Biochem. Biophys.
149:323-326.
- (32) HOWARD, J. SHANNON, L., OKI, L. and MURASHIGE, T. (1977).
Soybean agglutinin. A mitogen for soybean callus
cells, Exp. Cell. Res., 107:448-450.
- (33) JAFFÉ, W.G. (1969). Hemagglutinins, in LIENER, I.E. ed.
Toxic constituents of plant foodstuffs, Academic Press,
New York, 500pp.
- (34) JANZEN, D.H. and JUSTER, H.B. (1976). Insecticidal action
of the phytohemagglutinin in black beans on a bruchid
beetle. Science 192:795-796.
- (35) KAUSS, H. (1977). B. Physiology I. Plant lectins
(Phytohemagglutinins) Prog. Bot., 38:58-70.
- (36) KAUSS, H. and GLASER, C., (1974). Carbohydrate-binding
proteins from plant cell walls and their possible
involvement in extension growth. FEBS LETT., 45(1):
304-307.
- (37) LARKIN, P.J. (1978). Plant Protoplast agglutination by
lectins. Plant Physiol. 61: 626-629.
- (38) LIENER, I.E. (1964). Seed hemagglutinins. Econ. Bot.,
18:27-33.
- (39) LIENER, I. (1976) Phytohemagglutinins (Phytolectins).
Ann. Rev. Plant Physiol., 27:291-319.
- (40) MÄKELÄ, O. (1957). Studies in hemagglutinins of
leguminosae seeds. II. Occurrence of agglutinins in
plants. Ann. Med. Exp. Biol. FENNIAE, 35:32-133.
- (41) MANEN, J.F., in MIÉGE, J. (1975). Les Protéines des
Graines, Georg Éditeur, Genève, 386pp.

- (42) MARTIN, F.W., WASCZENKO-ZACHARCZENKO, E., BOYD, W.C. and SCHERTZ; K.F. (1964). Lectin content of the lima-bean during development of the seed and seedling, Ann. Bot. (London), 28;321-324, citado em 41.
- (43) MIALONIER, G., PRIVAT, J.P., MONSIGNY, M., KAHLEM, G. et DURAND, R. (1973). Isolement, propriétés physico-chimiques et localisation in vivo d'une phytohémagglutine (lectine) de *Phaseolus vulgaris* L. (var. rouge), Physiol. Vég., 11(3):519-537.
- (44) MOREIRA, R.A. (1975). Isolamento e caracterização de uma lectina de *Phaseolus vulgaris*. Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 111pp.
- (45) MOREIRA, R.A. and AINOUS, I.L. (1980). Lectins from seeds of jack fruit (*Artocarpus integrifolia* L.). I. Isolation and purification of two isolectins from the albumin fraction. Aceito para publicação em *Biologia Plantarum*.
- (46) MOREIRA, R.A. and PERRONE, J.C. (1977). Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. Plant Physiol. 59:783-789.
- (47) NORDBRING-HERTZ, B. (1979). Action of a nematode-trapping fungus shows lectins mediated host microorganism interaction. Nature 281:477-479.
- (48) NASPITZ, Ch.K. and RICHTER, M. (1968). The action of phytohemagglutinin in vivo and in vitro, a review. Progr. Allergy, 12:1-85.
- (49) OLIVEIRA, J.T.A. (1980). Estudo comparativo de lectinas presentes em sementes de três representantes do gênero *Artocarpus*. Tese de mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 107pp.

- (50) OLSON, M.O.J. and LIENER, E. (1967). The association and dissociation of the Concanavalin A, the phyto-hemagglutinin of the jack bean. Biochemistry, 6(12): 3801-3808.
- (51) POWER and CAMBIER (1889). On the chemical constituents an poisonous principle of the bark of *Robinia pseudoacacia*. Read before the Wisconsin Academy of Sciences, Arts and Letters, Pharm, Rosch. (1890) p.29, citado em 24.
- (52) PUEPPKE, S.G., BAUER, W.D., KEBOSTRA, K. and FERGUSON, A.L. (1978). Role of lectins in plant-microorganism interactions. II Distribution of soybean lectin in tissues of *Glycine max* (L.) Merr. Plant Physiol. 61: 779-784.
- (53) PUNIN, W. (1952). Uber den wirkungsmechanismus der pflanzlichen anti-O-agglutinine, Z. Naturf. 7b:48-50, citado em 41.
- (54) RENKONEN, K.O. (1959). The development of hemagglutinins in the seeds of *Vicia cracca*. Ann. Med. Exp. Biol. FENNIAE, 38:26-29.
- (55) RENKONEN, K.O. and KARJANNE, K. (1961). The hemagglutinin and their inhibitors in the seeds of *Vicia cracca*. Ann. Med. Exp. Biol. FENNIAE, 39:313-315.
- (56) ROGERS, D.J. and BLUNDEN, G. (1977). *Ptilota plumosa*, a new source of a blood-group B specific lectin. Med. Lab. Sci., 34:193-200.
- (57) ROUGÉ, P. (1974). Etude de la phytohémagglutinine des graines de Lentille au cours de la germination et des premiers stades du développement de la plante. Evolution dans les cotylédons. C.R. Acad. Sc. Paris, t. 278 série D:449-452.

- (58) ROUGÉ, P. (1974). Etude de la phytohémagglutinine des graines de lentille au cours de la germination et des premiers stades du développement de la plante. Evolution dans les racines, les tiges et les feuilles. C.R. Acad. Sc. Paris, t, 278 série D. 3083-3086.
- (59) ROUGÉ, P. (1975). Devenir des phytohémagglutinines provenant des diverses parties de la graine dans les jeunes germinations du pois, C.R. Acad. Sc. Paris, t. 280, série D:2105-2108.
- (60) ROUGÉ, P. et LABROUSE, L. (1977). Sur le rôle des phytohémagglutinines dans la fixation spécifique des souches compatibles de *Rhizobium leguminosarum* sur le Pois. C.R. Acad. Sc. Paris, t. 284, série D:2423-2425.
- (61) SAINT-PAUL, M. (1961). Les Hémagglutinines végétales. Transfusion 4:3-37, citado em 16.
- (62) SARKANY, I. and CARON, G.A. (1966). Effect of phytohaemagglutinin on guinea-pig skin in vivo, Nature, 210:105-106.
- (63) SHARON, N. (1977). Lectins. Sci. Amer., 236(6):108-119.
- (64) SHARON, N. and LIS, H. (1972). Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. Science 177(3):949-959.
- (65) SHARON, N., LIS, H. and LOTAN, R. (1974). On the structural diversity of lectins, in *Methodologie de la structure et du métabolisme des glycoconjugués*. Colloques internationaux du CNRS, n° 221, volume 1, 20-27 juin, 1973, édition du CNRS.
- (66) SHEPARD and MOORE, K.G. (1978). Concanavalin A - mediated agglutination of plant plastids, Planta 138:35-39.
- (67) SIMPSON, D.L., THORNE, D.R. and LOH, H.H. (1978). Lectins: endogenous carbohydrate-binding proteins from vertebrate tissues: functional role in recognition processes? Life Sci, 22:727-748.

- (68) SOUTHWORTH, D. (1975). Lectins stimulate pollen germination, Nature 258(5536):600-602.
- (69) TOMS, G.C. and WESTERN, A. (1971). Phytohaemagglutinins, in HARBORNE, J.B., BOULTER, D. and TURNER, B.L., Chemotaxonomy of the Leguminosae. Academic Press, London, 611pp.
- (70) TRIEBOLD, H.O. (1946). Quantitative analysis with applications to agricultural and food products. New York, D. Van Nostrand Co., 331pp.
- (71) TUNNIS, M. (1964). J. Immunol., 92:964, citado em 29.
- (72) von EISLER, M. and von PROTHEIM, L. (1912). Uber Hämagglutinin in Euphorbien, Zbl. Bakt, I. Abt. Orig. 66:309, citado em 24.
- (73) von EISLER, M. and von PORTHEIM, L. (1926). Weitere über hämagglutining in pflanzen. Z. Immunoforsch, 47: 59-82, citado em 16.
- (74) VOSS, E.W., FRYER, J.L. and BANOWETZ, G.M. (1978). Isolation, and partial characterization of a lectin from chinook salmon ova. Arch. of Biochem. Biophys., 186(1):25-34.
- (75) WEBER, K. and OSBORN, M. (1969). The reability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 4406-4412.
- (76) WEEKE, B., AXELSEN, N.H. and KROLL, J. A manual electrophoresis, methods and applications. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1973, 169pp.
- (77) WOLPERT, J.S. and ALBERSHEIM, P. (1976). Host simbiotic interactions I. The lectins of legumes interact with the O-antigen-containing lipopoly saccharides of therir simbiotic *Rhizobia*. Biochem. Biophys. Res. commun., 70(3):729-737.

- (78) WONG, P.P. (1980). Interactions between Rhizobia and lectins of lentil, pea, broad, bean and jackbean. Plant Physiol. 65:1049-1052.
- (79) XAVIER-FILHO, J. and MOREIRA, R.A. (1978). Visualization of proteinase inhibitors in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem., 244(16):4406-4412.

VII. COMUNICAÇÕES A CONGRESSOS

45 - G.1.12 LECTINAS DE SEMENTES DE FEIJÃO DE BOI (*Canavalia brasiliensis*)
Benildo de Sousa Cavada e Renato de Azevedo Moreira. Dept. de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 1065, Fortaleza, Ceará.

As lectinas são proteínas que possuem sítios de reconhecimento ou de ligação que as tornam capazes de formar complexos com os carboidratos presentes na superfície celular, possibilitando assim a aglutinação das mesmas. Através desta interação as lectinas são responsabilizadas por uma série de efeitos fisiológicos desde a aglutinação de eritrócitos e leucócitos até interação com bactérias do solo (tipo *Rhizobium*). Para melhor compreender os diversos papéis desempenhados pelas lectinas na planta é necessário a purificação das mesmas. Visando isto estão sendo estudadas as lectinas presentes em sementes de *Canavalia brasiliensis*.

Extratos salinos (NaCl 0,15 M) de sementes de *C. brasiliensis* contêm uma alta atividade hemaglutinante (960 UH/g de farinha). Após diálise contra água, praticamente toda a atividade hemaglutinante se concentra na fração globulinica (cerca de 90%). Por fracionamento com sulfato de amônio toda a atividade se concentra na fração que precipita entre 50 e 80% de saturação. Quando a fração ativa é submetida a cromatografia em coluna de Sephadex G-50, em NaCl 0,15 M, toda a atividade hemaglutinante fica retida enquanto as proteínas inativas são eluídas. A atividade só é eluída com uma solução de NaCl 0,15 M. Mostrou-se ainda que as lectinas de *C. brasiliensis* necessitam de íons divalente como o Ca^{++} e Mn^{++} para se tornarem ativas, e tem sua atividade inibida em presença de glicose

(UFC, FINEP, CNPq, CAPES)

31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da
Ciência - Fortaleza, julho de 1979

Publicado no Livro de Resumos

Supplement to:

PLANT PHYSIOLOGY

Board 16

565

HEMAGGLUTINATING ACTIVITY DURING THE GERMINATION OF
Canavalia brasiliensis

B.S.Cavada & R.A.Moreira, Dept Bioquímica e Biologia
Molecular, Univ. Fed. Ceará, CP 1065, Fortaleza (CE) Brasil

Changes in size, fresh and dry weight, protein content and hemagglutinating activity were followed during germination and initial stages of development of *Canavalia brasiliensis* as a preliminary approach to study the role of lectins in plants. Seeds were soaked in conc. H_2SO_4 for 50 min, and then grown without nutrients, in a moist dark chamber, at $30^\circ C$. Sample lots of seedlings were harvested at 2 day intervals up to the 15th day. The protein content, extracted with NaCl pH 6.0, remains constant up to the 3rd day and then decreases to a constant value from the 9th day. The hemagglutinating activity, present only in the cotyledons (8700 HU/part) increases in the first day (12500 HU/part) and then decreases to a constant value (1500 HU/part) from the 9th day. The hemagglutinating activity decrease follows the protein depletion as well as the decrease in dry weight, indicating that the lectins may belong to the group of reserve proteins, having no active function during the first stages of germination. (Grants from CNPq & FINEP)

*Program and abstract of papers
for the Annual Meeting of the
American Society of
Plant Physiologists and the
Phytochemical Society of
North America at
Washington State University
Pullman, Washington
August 3-7, 1980*



25

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LECTINAS PRESENTES EM SE-
MENTES DE Canavalia brasiliensis Mart.

B. S. CAVADA e R. A. MOREIRA

Dept. de Bioquímica e Biologia Molecular - Universidade Federal
do Ceará, Caixa Postal 1065, Fortaleza, Ceará.

Dando continuidade às investigações feitas com lectinas de Canavalia brasiliensis Mart. (Cavada, B.S. e Moreira, R.A.- 31 R.A. SBPC, 1979), foram feitos estudos de caracterização parcial da fração que precipita entre 50 e 90% de saturação de sulfato de amônio e da fração isolada por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 (P3).

As lectinas de C. brasiliensis Mart. se caracterizam por apresentarem fraca atividade contra hemácias humanas, mas valores elevados quando testadas com hemácias de gato e coelho. Quando a fração 50/90 foi submetida a inibição por açúcares simples foi encontrado que glicose, manose e frutose inibem esta atividade (31,9, 143,2 e 282,1 mg/mg de fração respectivamente), enquanto galactose não foi capaz de inibir a atividade hemaglutinante mesmo em soluções com até 5×10^3 mg/mg de fração. É interessante ressaltar que a manose, em concentrações iguais ou superiores a 512 mg/mg de fração comporta-se como um ativador, enquanto em concentrações inferiores inibe a atividade hemaglutinante. Verificou-se ainda que 1 ml de soro normal de coelho é capaz de inibir a atividade hemaglutinante de 1,31 mg de Extrato Total de C. brasiliensis Mart.

O Extrato Total quando submetido a eletroforese em gel de poliácridamida em presença de SDS e beta-mercaptoetanol apresentou 8 bandas principais com PM variando de 10.000 a 50.000 daltons, quatro das quais estão presentes em todas as frações ativas; apresentando-se a fração P3 composta predominantemente por subunidades de PM de 26.000 daltons.

Por imunoeletroforese em gel de agarose contendo antissoro contra Extrato Total de C. brasiliensis Mart., das diversas frações, notou-se a presença de pelo menos 5 bandas, 2 das quais são sempre encontradas em experimentos semelhantes com antissoro contra a fração P3, indicando a presença de 2 entidades antigênicas naquela fração ativa.

(CAPES, CNPq, FINEP, UFC)

I Reunião Regional da Sociedade Brasileira
de Bioquímica - Fortaleza, setembro, 1980.
Publicado no Livro de Resumos