

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LECTINA DE Dioclea
grandiflora Mart.

ANA CECILIA HORTA BARROS

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA, COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - 1982

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

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

Ana Cecília Horta Barros

DISSERTAÇÃO APROVADA EM

22/10/82

Renato de Azevedo Moreira, D.Sc
Orientador da Dissertação

Iracema Lima Ainouz

Maria da Guia Silva Lima, D.E.S.

Ao ARMINDO,
a minha filha RENATA,
aos meus pais
e aos meus irmãos

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

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

Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) 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 (Projeto de Pesquisas em Sementes).

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

AGRADECIMENTOS

Ao professor RENATO DE AZEVEDO MOREIRA, pela dedicação com que orientou a execução deste trabalho como pelo estímulo permanente e confiança em mim depositada durante todo o meu curso de mestrado.

Aos professores IRACEMA LIMA AINOUZ e MARIA DA GUIA SILVA LIMA, pelas sugestões e discussões apresentadas durante a realização desta dissertação.

Ao Dr. ARPAD J. PUSZTAI, do Rowett Research Institute, Aberdeen Escócia, pelas determinações da composição de aminoácidos e peso molecular por equilíbrio de sedimentação.

Ao JOAQUIM MARQUES pela determinação da análise elementar da semente em estudo.

A todos os colegas, funcionários e professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela amizade e solidariedade e em particular ao professor JOSÉ TADEU ABREU DE OLIVEIRA pela colaboração precisa e sincera desde a época de minha iniciação na pesquisa.

De modo muito especial ao meu esposo que com colaboração, compreensão e renúncia contribuiu para a execução deste trabalho, e aos meus pais que com sacrifício e perseverança muito ajudaram na minha formação profissional.

SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	ix
<u>LISTA DE TABELAS</u>	xi
<u>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</u>	xii
<u>RÉSUMO</u>	xiv
<u>ABSTRACT</u>	xvi
1 - <u>INTRODUÇÃO</u>	1
2 - <u>MATERIAIS</u>	13
3 - <u>MÉTODOS</u>	15
3.1 - <u>Preparação da Farinha</u>	15
3.2 - <u>Análise Elementar</u>	15
3.2.1 - <u>Determinação da Umidade</u>	15
3.2.2 - <u>Determinação do Nitrogênio Total</u>	15
3.2.3 - <u>Determinação de Lipídios Totais</u>	16
3.2.4 - <u>Determinação de Cinzas</u>	16
3.3 - <u>Determinação de Proteínas</u>	17
3.4 - <u>Determinação da Atividade Hemaglutinante</u>	17
3.5 - <u>Determinação do pH Ótimo de Extração</u>	17
3.6 - <u>Fracionamento das Proteínas</u>	18
3.6.1 - <u>Extração das Proteínas</u>	18
3.6.2 - <u>Fracionamento do Extrato Total por Precipitação Salina</u>	18
3.7 - <u>Efeito dos Cátions Ca²⁺ e Mn²⁺ sobre a Atividade Hemaglutinante</u>	18
3.8 - <u>Cromatografia de Afinidade em Coluna de Sephadex G-50</u>	19
3.9 - <u>Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS e Beta-mercaptoetanol</u>	19
3.10 - <u>Cromatografia de Fração PIII em Coluna de DEAE-celulose</u>	20

3.11	- <u>Cromatografia da Fração PIII em Coluna de CM-celulose</u>	21
3.12	- <u>Preparação de Anti-soro Anti-Extrato Total</u> .	21
3.13	- <u>Preparação de Imunoglobulina G (coelho) anti-PIII de Dioclea grandiflora</u>	22
3.14	- <u>Imunodifusão</u>	22
3.15	- <u>Cromatografia da Fração PIII em Coluna de Biogel P-100 a Diferentes Valores de pH</u>	24
3.16	- <u>Cromatografia da Fração PIII em Coluna de Sephadex G-50 a Diferentes Valores de pH</u> ...	25
3.17	- <u>Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante por Açúcares Simples</u>	25
3.18	- <u>Espectros de Absorção da Fração PIII</u>	26
3.19	- <u>Composição Química</u>	26
4	- <u>RESULTADOS</u>	28
4.1	- <u>Caracterização da Semente de Dioclea grandiflora Mart.</u>	28
4.2	- <u>Efeito do pH na Extração da Atividade Hemaglutinante de Dioclea grandiflora Mart.</u>	28
4.3	- <u>Extração da Lectina a pH 5,0 (Extrato Total)</u>	28
4.4	- <u>Fracionamento do Extrato Total por Precipitação com Sulfato de Amônio</u>	33
4.5	- <u>Efeito dos Cátions Ca^{2+} e Mn^{2+} sobre a Atividade Hemaglutinante</u>	33
4.6	- <u>Cromatografia de Afinidade da Fração 50/70 em Coluna de Sephadex G-50</u>	37
4.7	- <u>Cromatografia da Fração PIII em Coluna de DEAE-celulose</u>	40
4.8	- <u>Cromatografia da Fração PIII em Coluna de CM-celulose</u>	40
4.9	- <u>Imunodifusão Dupla de Ouchterlony</u>	40
4.10	- <u>Cromatografia da Fração PIII em Coluna de Biogel P-100 a Diferentes Valores de pH</u>	44

4.11	- <u>Cromatografia da Fração PIII em Coluna de Sephadex G-50 a Diferentes Valores de pH ..</u>	46
4.12	- <u>Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS e Beta-mercaptoetanol</u>	46
4.13	- <u>Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante da Fração PIII</u>	49
4.14	- <u>Espectros de Absorção</u>	49
4.15	- <u>Composição Química</u>	49
5	- <u>DISCUSSÃO</u>	54
6	- <u>CONCLUSÕES</u>	58
7	- <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	60
8	- <u>COMUNICAÇÕES A CONGRESSOS</u>	70

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Esquema geral para obtenção de IgG de coelho anti - PIII.....	23
2	Sementes de <u>Dioclea grandiflora</u>	29
3	Efeito do pH sobre a extração das proteínas e da atividade hemaglutinante da semente de mucunã	31
4	Esquema geral de obtenção das frações precipitadas com sulfato de amônio a partir do Extrato Total	34
5	Cromatografia de afinidade da fração 50/70 em coluna de Sephadex G-50	38
6	Cromatografia da fração PIII em coluna de DEAE-celulose	41
7	Cromatografia da fração PIII em coluna de CM-celulose	42
8	Imunodifusão dupla em gel de agar das diversas frações obtidas no curso da purificação da lectina (PIII) de <u>D. grandiflora</u>	43
9	Cromatografia da fração PIII em coluna de Biogel P-100 à diferentes valores de pH	45
10	Cromatografia de afinidade da fração PIII em coluna de Sephadex G-50 à diferentes valores de pH	47
11	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS de todas as frações obtidas nas diversas etapas de purificação a partir da farinha, tratada com beta-mercaptoetanol	48

FIGURA

Página

12 Espectro de absorção da fração PIII de Dioclea grandiflora

51

LISTA DE TABELAS

TABELAS		Página
1	Propriedades das lectinas e possíveis funções biológicas	8
2	Composição mínima da farinha de sementes de <u>Dioclea grandiflora</u> com base no peso seco e expressa em percentagem ..	30
3	Extração das proteínas e atividade hemaglutinante de semente de <u>Dioclea grandiflora</u> e diferentes valores de pH	32
4	Teor de proteína e atividade hemaglutinante no Extrato Total e nas frações obtidas por precipitação com sulfato de amônio	35
5	Efeito dos cátions Ca^{2+} e Mn^{2+} na atividade hemaglutinante	36
6	Total de proteína e atividade hemaglutinante de sementes de <u>Dioclea grandiflora</u> recuperadas nos diversos estágios de purificação	39
7	Inibição da atividade hemaglutinante da fração PIII por açúcares simples ..	50
8	Composição de aminoácido da lectina de <u>Dioclea grandiflora</u>	52

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

Con A	Concanavalina A.
PHA	Fitohemaglutinina de <u>Phaseolus vulgaris</u> .
SDS	Dodecil sulfato de sódio.
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano.
F0/50	Fração do Extrato Total precipitada com 50% de saturação de sulfato de amônio.
F50/70	Fração do Extrato Total precipitada entre 50-70% de saturação de sulfato de amônio.
F70/90	Fração do Extrato Total precipitada entre 70-90% de saturação de sulfato de amônio.
PI	Primeira fração, não retida em coluna de Sephadex G-50.
PIII	Fração retida em coluna de Sephadex G-50.
P ₁ e P ₂	Frações obtidas por cromatografia em coluna de Biogel P-100 a pH 8,3 a partir da fração PIII.
E _{1cm} ^{1%}	Coeficiente de extinção de uma solução a 1% em uma célula de 1cm de caminho ótico.
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 0,15 M.
DEAE-celulose	Dietilaminoetil-celulose.

CM-celulose Carboximetil-celulose.
DEAE-Sephadex Dietilaminoetil-Sephadex.
IgG Imunoglobulina G.

RESUMO

A lectina de mucunã de caroço (Dioclea grandiflora Mart.) foi isolada por extração a pH 5,0 (tampão acetato 0,1 M) e purificada por precipitação com sulfato de amônio (entre 50 e 70% de saturação), seguida de cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50. A atividade da lectina mostrou-se dependente de Ca^{2+} e Mn^{2+} .

Quando o Extrato Total a pH 5,0 foi precipitado com sulfato de amônio, verificou-se que cerca de 79% da atividade hemaglutinante concentrou-se na fração que precipita entre 50 e 70% de saturação. Quando esta fração foi aplicada em uma coluna de Sephadex G-50, toda a atividade hemaglutinante ficou retida (PIII), sendo liberada por eluição a pH ácido (tampão glicina-HCl pH 3,0). Resultado semelhante foi obtido quando uma solução de glicose foi utilizada em lugar do tampão.

A lectina de Dioclea grandiflora, quando tratada com SDS e beta mercaptoetanol e submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, apresentou 3 subunidades com pesos moleculares da ordem de 8-9.000, 13-14.000 e 25-26.000 daltons. A lectina mostrou-se como um sistema associante dependente de pH, quando submetida a cromatografia em coluna de Biogel P-100, apresentando pesos moleculares aparentes variando de 12.000 (pH 2,0) a \geq 70.000 (pH 10,0). Estes valores de peso molecular foram muito baixos quando comparados àqueles obtidos por equilíbrio de sedimentação, sugerindo assim a existência de uma possível interação com o gel e um conseqüente atraso nos volumes de eluição.

Como a lectina de Dioclea grandiflora possui a propriedade de interagir com Sephadex, foi investigada a possível relação entre o estado de associação e a afinidade por polidex

trans, através de cromatografias de afinidade em colunas de Sephadex G-50 a diferentes valores de pH. Verificou-se que a interação lectina-Sephadex é fortemente influenciada pelo pH do meio, sugerindo uma dependência da atividade em relação à estrutura.

A lectina é inibida por glicose, manose e frutose, não contém carboidratos na sua estrutura, tem uma composição de aminoácidos que se caracteriza pela ausência de cisteína e baixo teor de metionina e apresenta um valor de $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ de 12,0 a 280 nm quando dissolvida em NaCl 0,15 M.

ABSTRACT

The lectin of Dioclea grandiflora, Mart. was isolated by extraction at pH 5,0 (acetate buffer 0,1M) and purified by ammonium sulphate precipitation (between 50-70% saturation) followed by affinity chromatography on a Sephadex G-50 column. The lectin requires Ca^{2+} and Mn^{2+} for its activity.

When the Full Extract at pH 5,0 was precipitated by ammonium sulphate, 79% of the hemagglutinating activity was recovered in the fraction that precipitates between 50% and 70% saturation. When the referred fraction was applied on a Sephadex G-50 column, all the hemagglutinating activity was retained (PIII), and furtherly released by elution with an acidic buffer (glycine-HCl buffer pH 3.0). Similar result was obtained when a solution of glucose was used instead of glycine buffer pH 3.0.

The lectin of Dioclea grandiflora, treated with SDS and beta-mercaptoethanol and submitted to polyacrilamide gel electrophoresis with SDS exhibited 3 subunits with molecular weights of 25-26,000, 13-14,000 and 8-9,000 daltons. The lectin was shown to be an associating system which is dependent on pH, when submitted to Biogel P-100 chromatography, presenting apparent molecular weights from 12,000 (pH 2.0) to \geq 70,000 daltons (pH 10.0). These molecular weight values are very much lower than those obtained by sedimentation equilibrium, suggesting the existence of an interaction with the gel and a consequent delay of the elution.

Once the Dioclea grandiflora lectin interacts with Sephadex a possible relationship between the associated form and the affinity for polydextrans was investigated using a Sephadex G-50 affinity column at different pHs. It has been

shown that the lectin-Sephadex interaction is strongly influenced by the pH, suggesting that the lectin activity is dependent on its structure.

The lectin is inhibited by glucose, mannose and fructose, does not contain carbohydrates in its structure. The aminoacid composition is characterized by the absence of cystein and a low content of methionine. A value for $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ of 12.0 at 280 nm when the lectin was dissolved in NaCl 0,15 M was obtained.

1 - INTRODUÇÃO

Um número cada vez maior de estudos feitos com lectinas e a concomitante descoberta de novas propriedades para estas substâncias, dificulta uma definição precisa e biologicamente significativa do que seja "lectina".

O nome "lectina" foi originalmente proposto por BOYD e SHARPLEIGH (1954) para designar substâncias de origem vegetal, capazes de aglutinar hemácias, frequentemente mostrando alta especificidade de grupo para eritrócitos humanos, como também para eritrócitos de diferentes espécies animais. Embora o nome "lectina" seja comumente usado como sinônimo para "fitohemaglutinina", tornou-se necessário modificar a definição original para incluir substâncias encontradas em outras fontes, como bactérias, fungos, algas, peixes e líquens (GOLD & BALDING, 1975).

Foi proposto por LIENER (1976a) que o nome "lectina" fosse usado para designar todas as proteínas que fixam açúcar, com talvez, uma posterior classificação como "zoolectinas", "fitolectinas" ou "micolectinas", dependendo delas serem de origem animal, vegetal ou fúngica, respectivamente. O autor propôs ainda que aquelas lectinas que não aglutinam células mas exibem algumas outras propriedades tais como mitogenicidade ou toxicidade, fossem simplesmente definidas como lectinas mitogênicas ou lectinas tóxicas. Mais recentemente, entretanto, GOLDSTEIN e colaboradores (1980), definiram lectinas como proteínas ou glicoproteínas, de origem não imune, que fixam açúcar e aglutinam ou precipitam glicoconjugados. Segundo estes autores, lectinas devem ainda possuir dois sítios de ligação para açúcar, aglutinar células vegetais e animais e precipitar polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídios. Seriam excluídas desta classe algumas proteínas ligantes de açúcar como enzimas específicas (glicosidases, glicosiltransferases, glicosilquinase, glicosil

permeases, glicosilpolimerase), proteínas de transporte e hormônios, mesmo que, sob certas condições possam agir como lectinas. HOREJSI e KOCOUREK (1974), mostraram que lisozima monovalente, isto é, não aglutinante, pode ser convertida em hemaglutinina multivalente por tratamento com glutaraldeído. Além dessas substâncias, algumas toxinas que apresentem semelhanças com as lectinas verdadeiras, mas que possuam apenas um sítio para ligação de açúcar, também não deveriam ser chamadas de lectinas, pois não aglutinam células nem precipitam glicoconjugados.

1.1 - Propriedades gerais das lectinas

Os mais diferentes efeitos têm sido observados devido à interação da lectina com os açúcares da superfície celular. Entre esses, os mais estudados têm sido a aglutinação e a estimulação mitogênica.

Além da propriedade de aglutinar eritrócitos, que deu origem a sua descoberta, as lectinas aglutinam muitos outros tipos de células. O interesse na aglutinação de células por lectinas tem sido estimulado pela capacidade dessas substâncias de aglutinar diferentemente células normais e células malignas. Como as lectinas aglutinam mais intensamente células cancerígenas, esta propriedade é utilizada nas pesquisas sobre o câncer e ainda permite prever uma ação terapêutica possível contra o crescimento de tecidos tumorais (SHARON e LIS, 1974). Algumas lectinas inclusive, mostram atividade anti-tumoral (LUTSYK et al., 1977).

GOLDBERG (1967) entre outros, mostrou que os extratos de germe de trigo presumivelmente contendo lectina, aglutinam mais facilmente as células tumorais do que as células normais. BIDDLE e colaboradores (1970), estudando também a aglutinação de células tumorais por extratos de germe de trigo, observou

que as mudanças na superfície das células depois da transformação maligna, envolve modificações em certos grupos químicos contendo N-acetilglicosamina, parecendo assim aumentar o número de receptores disponíveis ao ataque pela lectina. Observação semelhante foi feita por SELA e colaboradores (1970), estudando a ação da lectina de soja sobre células normais e transformadas. Ele observou ainda que as mesmas células quando normais só eram aglutinadas pela lectina depois de sofrerem tratamento prévio com tripsina e pronase. Tem sido citado ainda a aglutinação de "slime mold" (KAUS, 1977), vírus (ORAM et al., 1971), espermatozoides humanos (GOLD e BALDING, 1975) e mitocôndrias de levedura (SCHOUSBOE, 1979) por lectinas.

Algumas lectinas são capazes de aglutinar também células vegetais. LARKIN (1978) mostrou que as lectinas de Canavalia ensiformis, Glycine max, Ricinus communis e Arachis hypogaea eram capazes de aglutinar protoplastos de diferentes espécies de plantas. Este efeito também foi encontrado por CHIN e SCOTT (1979) com as lectinas de Canavalia ensiformis, Phaseolus vulgaris e germe de trigo.

O efeito mais dramático da interação de lectinas com células, no entanto, é seu efeito mitogênico sobre linfócitos. Esta propriedade tem sido utilizada no estudo das mitoses anormais (anomalias cromossômicas), no estudo dos eventos bioquímicos da ativação dos genes e no estudo dos mecanismos celulares da imunidade (SHARON & LIS, 1972 e MANEN, 1975).

A lectina de Phaseolus vulgaris (PHA) foi a primeira lectina mitogênica descoberta (NOWELL, 1960). Durante os últimos tempos, no entanto, o número de lectinas mitogênicas tem aumentado consideravelmente. Entre estas podem ser citadas as lectinas encontradas em outras variedades de Phaseolus vulgaris (JAFFÉ et al., 1974), de Lens culinaris (DOWNING, 1968) e em Canavalia ensiformis (LIS & SHARON, 1981).

Além da ação mitogênica sobre células animais, há indi

cação de que as lectinas também agem sobre culturas de tecidos vegetais. HOWARD e colaboradores (1977) mostraram que a lectina de soja (Glycine max) interage com células de "callus" da mesma planta, aumentando o número, o peso das células e a síntese de DNA, três respostas indicativas da ação mitogênica. VASIL (1977) entretanto, testando o efeito de três diferentes lectinas (soja, PHA e germe de trigo) no crescimento de culturas de tecidos de raízes de soja e tabaco, não observou nenhum aumento significativo no crescimento, exceto no caso da lectina de germe de trigo que aumentou o crescimento de "explantos" de tabaco na presença de auxinas e citocininas.

1.2 - Toxicidade das lectinas

Lectinas tóxicas para células animais são principalmente encontradas nas famílias Euphorbiaceae e Leguminosae (JAFFÉ, 1969), mas apenas em alguns casos, seu mecanismo de ação a nível celular e molecular é conhecido em detalhe. O grau de toxicidade varia muito de intensidade de uma lectina para outra. A dificuldade na comparação de seus efeitos advem da diversidade das preparações, onde geralmente o grau de pureza da fração não é conhecido e dos diferentes tipos e raças de animais com as quais as lectinas são testadas, incluindo diferenças de idade e estado nutricional e até mesmo das diferentes técnicas empregadas nesses estudos (JAFFÉ, 1969 e LIENER, 1975).

O valor nutritivo e a digestibilidade das proteínas de leguminosas é aumentado por tratamento térmico prévio, devido à destruição do efeito tóxico de alguns fatores termolábeis (LIENER, 1962 e MUELENAERE, 1965). O baixo valor protéico e a digestibilidade do material não tratado foi, por muito tempo, atribuído à presença de inibidores de proteases, constituintes comuns de muitas leguminosas. Estudos recentes, porém, têm revelado que somente 40% da diminuição do crescimento de animais podem ser atribuídos à ação de inibidores de tripsina (LIENER,

1976). PUSZTAI, (1972) e PALMER e colaboradores (1973), trabalhando com Phaseolus vulgaris observaram que, enquanto o conteúdo de inibidores de tripsina aumentava inicialmente na germinação, o valor nutricional das proteínas, melhorava apreciavelmente. Como o conteúdo de aminoácidos dessas proteínas não era nutricionalmente muito favorável (PUSZTAI, 1981), estes resultados indicavam que a concentração do fator tóxico nas sementes (distintamente dos inibidores de tripsina) era reduzida gradualmente na germinação. Muitos outros autores também atribuíram às lectinas esses efeitos tóxicos (LIENER, 1953; LIENER, 1964; JAFFÉ, 1975; LIENER, 1976).

Diversos mecanismos têm sido sugeridos para a ação tóxica das lectinas. Segundo JAFFÉ (1969), o efeito tóxico das lectinas quando ingeridas oralmente, pode ser devido à ligação dessas proteínas em sítios específicos da superfície da parede intestinal, reduzindo assim a absorção dos nutrientes totais. Entretanto, PUSZTAI e colaboradores (PUSZTAI et al, 1979 e PUSZTAI et al, 1981), estudando os efeitos tóxicos causados em ratos por sementes de Phaseolus vulgaris L. cv. Processor observaram uma grande perda de nitrogênio na urina e nas fezes, constituída principalmente de nitrogênio corpóreo. Essa perda foi atribuída a alterações fisiológicas de células intestinais danificadas e a um aumento do catabolismo dos tecidos possivelmente causado por respostas imunes às lectinas absorvidas. Outras lectinas, como ricina e abrina, encontradas em sementes de Ricinus communis e Abrus precatorius respectivamente, mostram um diferente tipo de toxicidade. Estas lectinas inibem a síntese de proteína causando uma modificação na subunidade ribossomal 60S. Segundo os autores, esta modificação interfere com o sítio da GTPase impedindo assim a hidrólise do GTP, necessária para a ligação da subunidade ribossomal 60S ao fator de elongação 2 (OLSNES, et al., 1974; GASPERI-CAMPANI, 1977 e OLSNES & PIHL, 1978).

Além dessas lectinas, algumas outras são citadas como tóxicas. A modicina, lectina encontrada em raiz de Adenia di-

gitata, parece agir por um mecanismo similar a ricina e abrina. (OLSNES et al., 1978). Foi mostrado, entretanto, que a morte de animais alimentados com esta lectina vem depois de vômitos e diarréia sanguínea, tendo como sintomas pós-morte principalmente necrose e trombose vasculares no reto e intestino grosso, nefrite aguda e hemorragia no fígado (OLSNES et al., 1978). A toxicidade da lectina de soja foi estudada sob várias condições por LIENER (1953). Comparando a toxicidade da lectina de soja com a da lectina de Phaseolus vulgaris, estudada por JAFFÉ (1949), o mesmo autor (JAFFÉ, 1969), notou que esta última se apresenta mais tóxica para crescimento de ratos do que a de soja. A lectina de Phaseolus vulgaris causa uma rápida perda de peso e morte, enquanto a de soja permite um crescimento moderado dos animais experimentais.

Têm sido citadas ainda como lectinas tóxicas a crotina, extraídas de sementes de Croton tiglium, a curcina de Jatropha curcas e a robina encontrada em casca de árvore de Robinia pseudoacácia (JAFFÉ, 1969).

As lectinas induzem ainda a degranulação de mastócitos peritoneais de ratos com conseqüente liberação de histamina. Entre essas foram utilizadas a Con A, cujo efeito é melhor estudado, as lectinas de germe de trigo, de Ricinus comunis e de Glicyne max (ENNIS et al., 1981). Igual efeito foi encontrado em mastócitos peritoneais de camundongos usando-se a lectina de Phaseolus vulgaris cv. Processor (SILVA LIMA et al., 1981).

1.3 - Papel na planta

A descoberta da aglutinação de protoplastos bem como a ação mitogênica em células de "callus" forneceram indicações de um possível papel metabolicamente ativo na planta. Este papel não está ainda bem definido. É razoável, no entanto, esperar-se que o conhecimento das propriedades bioquímicas das lec

tinhas dizem sua função biológica endógena. Algumas funções que podem ser deduzidas a partir de algumas propriedades são sumarizadas na TABELA 1 (BARONDES, 1981).

Entre as possíveis funções das lectinas na planta, seu envolvimento na interação simbiótica bactéria-planta, com conseqüente fixação de nitrogênio, tem recebido a maior atenção. Este possível envolvimento das lectinas foi primeiro sugerido por HAMBLIN & KENT (1973). Eles mostraram que bactérias que nodulam feijão (Phaseolus vulgaris) são aglutinadas por extratos destas sementes, presumivelmente por interação com as lectinas presentes nestes extratos. Os autores verificaram ainda, que eritrócitos que podem ser aglutinados pela lectina de feijão se ligam às suas raízes. Baseados neste estudo preliminar, eles postularam a ligação da bactéria à raiz, por uma interação lectina-bactéria. Posteriormente, BOHLOOL & SCHMIDT (1974), evidenciaram que a lectina de soja interage especificamente com aquelas cepas de Rhizobium que se ligam exclusivamente às raízes de soja (R. japonicum). Utilizando derivados fluorescentes da lectina de soja os autores encontram que aquelas cepas de Rhizobium que não nodulam soja não ligam a lectina fluorescente e que a interação lectina-bactéria era inibida por haptenos específicos.

Um argumento contra a participação da lectina de soja na interação específica de R. japonicum surgiu dos estudos da distribuição dessa lectina em tecidos de plantas derivados de sementes normais (PUEPPKE et al., 1978). Os autores observaram que a mais alta taxa de nodulação em raízes de soja ocorria na quarta semana depois da semeadura, época em que o nível de lectina de soja nas raízes não era detectável, indicando que a participação da lectina na nodulação parecia dispensável. Entretanto, os autores levantaram a possibilidade que a lectina nessas raízes em crescimento, mesmo a níveis abaixo da sensibilidade dos métodos de ensaio, fosse suficientemente ativa para mediar a interação do Rhizobium.

TABELA 1 - Propriedades das lectinas e possíveis funções biológicas (BARONDES, 1981).

Propriedades	Funções
1. Sítios de ligações específicos a. Todos do mesmo tipo b. de tipos diferentes	Reconhecimento da complementaridade a receptores de oligossacarídeos.
2. Presença de mais de um sítio de ligação a carboidrato na mesma molécula.	a. Ligação cruzada entre glicoproteínas ou glicolipídios em membranas e/ou em soluções. b. Alta afinidade de ligação à moléculas ou à superfícies celulares com receptores múltiplos.
3. Aglutinação	Manutenção da união entre células: a. Com células idênticas (promovendo adesão, fusão, etc.) b. Com células diferentes (promovendo simbiose, infecção, fagocitose, etc.)
4. Abundância	Função mais estrutural que catalítica.
5. Não participação de membranas	Liberdade relativa de movimento em/ou entre compartimentos celulares.

Muitas outras especulações existem sobre o papel que a lectina poderia desempenhar na planta. Alguns autores acham que as lectinas servem de armazenadoras e transportadoras de carboidratos na planta em desenvolvimento ou simplesmente como uma proteína de reserva (BOYD, 1963). CAVADA (1980), estudando o comportamento da lectina de Canavalia brasiliensis durante a germinação, observou que as lectinas são mobilizadas mais tardiamente que as demais proteínas de peso molecular elevado, sugerindo que elas não seriam simples fornecedoras de aminoácidos.

Alguns pesquisadores estudando lectinas de diferentes espécies, encontraram muitas semelhanças estruturais entre elas, sugerindo que, durante a evolução, a conservação dessas características seria essencial para a sobrevivência do organismo, evidenciando assim que estas lectinas desempenhariam importantes funções fisiológicas nas plantas (FORIERS, et al., 1978; HOWARD et al., 1979; HANKINS et al., 1979). OLIVEIRA (1980) trabalhando com três representantes do gênero Artocarpus obteve resultados parecidos, encontrando ainda diversas propriedades químicas e fisicoquímicas semelhantes e estreito relacionamento imunológico entre todas as lectinas.

1.4 - Isolamento das lectinas

Os efeitos das lectinas contra os mais diversos tipos de células podem ser inibidos especificamente por açúcares simples, o que permitiu concluir que a interação da lectina com as células ocorre por ligações específicas a sacarídios da superfície celular (SHARON & LIS, 1972). Lectinas também fixam mono e oligossacarídeos e glicoproteínas, propriedade esta, usada no isolamento, purificação e no estudo da estrutura química de polímeros contendo carboidratos (LIS & SHARON, 1973). Esta propriedade tem levado a um desenvolvimento de novas técnicas de cromatografia de afinidade para purificação

de lectinas. Nesses métodos a lectina é retida em uma coluna apropriada, preparada a partir de derivado imobilizado do açúcar e é posteriormente eluída quer com o açúcar específico quer por abaixamento do pH do eluente (LIS et al., 1974).

As resinas comerciais como Sephadex e Sepharose são de grande utilidade. Algumas lectinas foram purificadas através de cromatografia de afinidade em gel de dextrana, destacando-se entre elas a Con A (AGRAWALL & GOLDSTEIN, 1972), as lectinas de ervilha (ENTLICHER et al., 1970), de lentilha (TICHÁ et al., 1970) e a lectina de Canavalia brasiliensis (CAVADA, 1980). Já a lectina de Abrus precatorius foi purificada em coluna de Sepharose (OLSNES et al., 1974). A Sepharose, entretanto, é mais comumente utilizada, como um meio de imobilização de uma grande variedade de açúcares ligantes. PER VRETBLAD (1976) utilizou a imobilização de N-acetil D-galactosamina e N-acetil D-glicosamina em Sepharose para purificar a lectina de soja e de grão de trigo, respectivamente. Outros procedimentos também têm sido utilizados, entre os quais se destacam o uso de hemácias íntegras insolubilizadas por tratamento com N-carboxianidroleucina (GALBRAITH & GOLDSTEIN, 1972) e o uso de estromas glutarizados preparados a partir de hemácias de porco e de homem imobilizados em gel de poliacrilamida (BETAIL et al., 1975) ou misturados a Sephadex G-25 (OCHOA et al., 1978).

OLIVEIRA (1980), também utilizou hemácias humanas glutarizadas numa tentativa de isolar as lectinas presentes em sementes de três representantes do gênero Artocarpus, porém o isolamento dessas lectinas requer métodos adicionais, pelo fato delas interagirem com outras substâncias que tanto podem ser carboidratos simples como glicoproteínas.

Uma interessante variação de cromatografia de afinidade foi usada por BESSLER & GOLDSTEIN (1973). Eles utilizaram a Con A para isolar lectinas possuindo como resíduo terminal a D-manose pela qual a Con A é específica. Estas lectinas glicoprotéicas foram retida em uma coluna de Sepharose ligada a

Con A e eluidas com metil- α -D-manopiranosídeo.

Entre as lectinas obtidas em estado puro, a Con A, lectina de feijão de porco (Canavalia ensiformis), é a melhor caracterizada. A Con A é uma proteína que em pH fisiológico se apresenta como um tetrâmero de subunidades idênticas, cada uma das quais contendo sítios para ligação de Ca^{2+} e Mn^{2+} e açúcares entre os quais, glicose, manose e frutose (BITTIGER & SCHNEBLI, 1976). KALB e LUSTIG (1968) usando o método de equilíbrio de sedimentação determinaram o peso molecular da Con A, o qual era constante entre pH 3,5 e 5,8, provavelmente devido ao fato de que a Con A se encontra principalmente na forma de dímeros e que acima de pH 5,8, o peso molecular aumenta de uma maneira variada, devido a sua capacidade de formar agregados de vários tamanhos.

O papel que os íons metálicos exercem na atividade da Con A tem sido objeto de consideráveis estudos. O fato da interação Con A-Sephadex depender da presença desses íons é certamente uma indicação da importância dos cátions metálicos divalentes para sua interação com sacarídeos (LIENER, 1976).

Uma vez que a Con A pode ser facilmente obtida na forma homogênea, tem suas características químicas e tridimensionais definidas e especificidade de ligação bastante estudada, ela é comumente utilizada no estudo do papel dos sacarídeos nas superfícies celulares, em aplicações biológicas e isolamento de macromoléculas como polissacarídeos e glicoproteínas. Além disso a Con A também aplicada no isolamento de vírus, de certas enzimas e de células em culturas de tecidos (BITTIGER & SCHNEBLI, 1976).

1.5 - Propósitos da investigação

As sementes de Dioclea grandiflora têm sido usadas em

épocas de grande penúria, como um substitutivo para a dieta humana, fornecendo uma farinha que se presta para o preparo de pão, bolo e beiju. Esta farinha, no entanto, é tóxica sendo necessário um aquecimento prévio antes de seu uso.

Com a finalidade de melhor se conhecer a lectina presente em sementes de Dioclea grandiflora Mart., visando uma posterior investigação com relação a sua participação na toxicidade dessas sementes, bem como o seu papel na planta, foi feito um estudo de extração, fracionamento e purificação da mesma. De posse da lectina pura, foram feitos estudos de caracterização parcial através de determinações de algumas das suas propriedades químicas, fisicoquímicas e biológicas.

2 - MATERIAIS

2.1 - Sementes

No presente trabalho foram utilizadas sementes de Dio-
clea grandiflora Mart., coletadas no município de Maranguape
(Ceará).

2.2 - Reagentes

Ovalbumina 2x cristalizada (lote nº Y3872), citocromo
c de coração de cavalo (lote nº ZZ1804), gama globulina huma
na (lote nº y4024) e quimiotripsinogênio pancreático 6x cris
talizado (lote nº AZ2068), da Schwarz/Mann, Orangeburg, New
York.

Albumina sérica bovina (fração V, 96-99%, lote 126c -
0199), ribonuclease A de pâncreas bovino 5x cristalizada (lo
te nº 23c-2390, tipo 1-A) e quimiotripsina pancreática 3x
cristalizada (lote nº 84c-0304), tipo 1) da Sigma Chemical
Co., St. Louis, EUA.

Blue dextran 2000 (lote nº 4474), Sephadex G-50 fina,
partículas de 20-80 μ (lote nº 0699) e dietilaminoetil Sephadex
A-50 partículas de 40-120 μ (lote nº 1835) da Pharmacia Uppsala,
Suécia.

Dodecil sulfato de sódio, beta-mercaptoetanol e carboxi
metil-celulose, de E. Merck, Darmstadt, Alemanha.

Acrilamida (lote 31F-0067) e N-N'-metilenobisacrilamida
(lote nº 21F-0257) da Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Dietilaminoetil-celulose (0,84 meq/ml), Nutritional
Biochemical Corporation, EUA.

Biogel P-100 - 100 a 200 mesh de BioRad laboratories,
USA.

Agar Oxoid de Oxoid limited, London.

Adjuvante completo de Freund de Difco laboratories, USA.

Os demais reagentes foram de grau analítico e obtidos
comercialmente.

3 - MÉTODOS

3.1 - Preparação da Farinha de Mucunã de Caroço

Para a obtenção de farinha, sementes de mucunã de caroço (Dioclea grandiflora Mart.), livres de tegumento, foram reduzidas a pequenos fragmentos e moidas em moinho de lâminas (Wiley) acoplada com peneira de 40 malhas por polegada linear (40 mesh). A farinha assim obtida foi armazenada em frascos hermeticamente fechados à temperatura ambiente.

3.2 - Análise Elementar

3.2.1 - Determinação de Umidade

Para a determinação de umidade, pesa-filtros previamente tarados, contendo de 1 a 2g de farinha de mucunã de caroço, foram colocadas em uma estufa a 110°C durante 24 horas e em seguida mantidos em um dessecador até atingir a temperatura ambiente. Os pesa-filtros foram pesados e recolocados na estufa por mais 3 horas, repetindo-se todo o processo até a obtenção de pesos constantes. O teor de umidade foi calculado pela relação entre o peso perdido por aquecimento e o peso da amostra, sendo esse valor expresso em percentagem.

3.2.2 - Determinação do Nitrogênio Total

O teor de nitrogênio total da farinha de mucunã de ca

roço foi determinado pelo método de semi-micro Kjeldahl (HILLER, 1948). A amostra de 200mg foram adicionados 3 ml de H_2SO_4 concentrado e 0,5 ml de $HgSO_4$ a 14% e a mistura deixada mineralizar até ser obtida uma solução incolor, que foi diluída para 100 ml com água destilada. A 10 ml da solução assim obtida foram adicionados, no destilador do Kjeldahl, 12 ml de NaOH 50%, 200 mg de zinco em pó e 2 ml de $Na_2S_2O_3$ 20% (BAKER, 1961). A amônia liberada foi coletada em 10 ml de ácido bórico a 2% e titulada com HCl 0,1 N.

3.2.3 - Determinação de Lipídios Totais

O teor de lipídios totais foi determinado essencialmente conforme o descrito por TRIEBOLD (1946) sendo o éter substituído por hexana. Amostras contendo de 2 a 3g de farinha foram pesadas em cartuchos de papel de filtro e os lipídios deixados extrair por refluxo em um extrator de Soxhlet com hexana normal, por pelo menos 3 horas. Após a extração o solvente foi evaporado em banho maria e o teor de lipídios foi calculado pela relação entre o peso de extrato hexânico e o peso seco da amostra e expresso em percentagem.

3.2.4 - Determinação de Cinzas

Para determinar o teor de cinzas, cadinhos de porcelana, previamente tarados, contendo de 1 a 2g de amostra, foram colocados em uma mufla a $600^{\circ}C$ até a incineração completa da matéria orgânica, sendo a seguir mantidos em dessecador até atingir a temperatura ambiente. O teor de cinzas foi calculado como a relação entre o peso do resíduo e o peso seco da amostra e expresso em percentagem.

3.3 - Determinação de Proteínas

A concentração de proteínas nos diversos extratos foi determinada pelo método do microbiureto (BAILEY, 1967) usando-se albumina sérica bovina como padrão.

A absorvância a 280 nm foi também utilizada para determinação da concentração de proteínas nos eluatos de coluna cromatográficas.

3.4 - Determinação da Atividade Hemaglutinante

A atividade hemaglutinante foi determinada utilizando-se o método descrito por MOREIRA (1975) modificado para o uso de hemácias de coelho e presença de Ca^{2+} e Mn^{2+} . Este ensaio foi utilizado para a determinação da atividade hemaglutinante em extratos, frações protéicas e eluatos de colunas cromatográficas.

3.5 - Determinação do pH Ótimo de Extração

A farinha de mucunã de caroço, obtida conforme o descrito no item 3.1, foi submetida a extração com NaCl 0,15M na proporção de 1:40 (peso/volume), sendo o pH ajustado para o valor desejado (2 a 10) com HCl ou NaOH. Após 4 horas de extração com agitação ocasional, a suspensão foi centrifugada a 15.000 x g por 20 min a 4°C, em uma centrífuga Sorval, modelo RC-5 e os sobrenadantes filtrados, desprezando-se os resíduos. O pH dos sobrenadantes foi novamente medido e os mesmos submetidos a dosagem de proteína e atividade hemaglutinante.

3.6 - Fracionamento das Proteínas

3.6.1 - Extração de Proteínas

Com os resultados obtidos no item 3.5, passou-se a extrair a lectina de Dioclea grandiflora a pH 5,0. A farinha foi submetida a uma extração exaustiva com tampão acetato 0,1M pH 5,0 contendo 0,15M de NaCl, na proporção de 1:20, conforme é mostrado na FIGURA 4. O extrato Total após diálise com água por 24 horas foi liofilizado e armazenado para uso posterior.

3.6.2 - Fracionamento do Extrato Total por Precipitação Salina

Sulfato de amônio sólido foi adicionado a alíquotas do Extrato Total de modo a atingir diferentes percentagens de saturação (0-50, 50-70 e 70-90) e as misturas foram deixadas em repouso por uma noite. Após centrifugação a 15.000 x g por 20 min a 4°C, os precipitados foram redissolvidos e dializados exaustivamente contra NaCl 0,15M até a remoção total do sulfato de amônio. Nas frações assim obtidas foram feitas determinações de teor protéico e da atividade hemaglutinante. As frações foram então dialisadas contra água destilada, liofilizadas e armazenadas em congelador para uso posterior.

3.7 - Efeito dos Cátions Ca²⁺ e Mn²⁺

Amostras de Extrato Total foram dissolvidas em NaCl 0,15M contendo Ca²⁺ e Mn²⁺ com as concentrações variando de 0 a 20 mM. As soluções assim obtidas foram testadas para a ati

vidade hemaglutinante, utilizando-se o método de aglutinação em placas de microtitulação.

3.8 - Cromatografia de Afinidade em Coluna de Sephadex G-50

Os experimentos de cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 foram realizados em uma coluna medindo 26,5 x 1,5 cm, preparada segundo DETERMAN (1969). O gel foi entumescido em água, por 48 horas, e a coluna montada deixando-se o gel sedimentar por gravidade. A coluna equilibrada com NaCl 1M contendo CaCl_2 5 mM e MnCl_2 5 mM, foi aplicada a fração F5070, dissolvida na mesma solução. A coluna foi eluída, inicialmente com a solução de equilíbrio até a obtenção de todo o material não retido, sendo então eluída com tampão glicina-HCl 0,1M pH 3,0, contendo NaCl 1M, CaCl_2 5 mM e MnCl_2 5 mM, a um fluxo de 20 ml/h.

A eluição foi acompanhada através de um sistema LKB Uvicord II, com registro de absorbância a 280 nm. Os efluentes da coluna foram recolhidos em frações de 3,6 ml em um coletor automático de frações LKB Radirac e tiveram as absorbâncias determinadas a 280 nm (espectrofotômetro Beckman DU) e a atividade hemaglutinante determinada pelo método já descrito (item 3.4).

3.9 - Eletroforese Descontínua em Gel de Poliacrilamida com SDS e Beta-mercaptoetanol

As amostras liofilizadas de Extrato Total, Albumina, Globulina, frações obtidas por precipitação com sulfato de amônio (F050, F5070, F7090), frações obtidas por cromatografia de afinidade (PI e PIII), resíduo e a farinha total, dis

solvidas em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 contendo 1% de SDS e 1% de beta-mercaptoetanol, e incubadas a 100°C por 20 minutos, foram submetidas a eletroforese descontínua, seguindo-se a técnica descrita por LAEMMLI (1970), adaptada para o uso de placas medindo 17 x 16,5 cm.

Para preparar as placas foi usado um gel de separação de 17,6% de poliacrilamida contendo 0,1% de SDS em tampão tris-HCl pH 8,8 e um gel espaçador de 4% de acrilamida, contendo 0,1% de SDS em tampão tris-HCl pH 6,8.

Alíquotas das amostras (ca. 20 µg de proteína) contendo azul de bromofenol a 0,05% (para visualização da frente de corrida) foram aplicadas aos poços preparados no gel espaçador e submetidas a seguir a uma corrente de 2,2 mA/cm durante 4 horas, utilizando-se uma fonte de corrente contínua LKB Multiphor e tampão tris-glicina 0,04M pH 8,3. A localização das bandas de proteína foi feita com Coomassie Brilliant Blue 0,005% em metanol:ácido acético : água (4 : 0,7 : 3,3) durante pelo menos 16 horas e o descolorimento com uma solução de ácido acético : água : metanol (1 : 8 : 3,5).

Para o cálculo dos pesos moleculares foi feito uma calibração utilizando-se soluções de 2 mg/ml de gama-globulina, ovalbumina, albumina sérica bovina, quimiotripsinogênio, ribonuclease e citocromo c.

3.10 - Cromatografia da Fração PIII em Coluna de DEAE-celulose

A fração PIII (obtida por cromatografia de afinidade em Sephadex G-50) foi submetida a cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose, preparada segundo PETERSON e SOBER (1962). O gel foi lavado em funil de Buchner acoplado a uma bomba de vácuo, com água, NaOH 0,1M, água, HCl 0,1M e água para eliminar as partículas finas. A resina foi então deixada se

dimentar por gravidade em uma coluna de 14,5 x 1,2 cm e posteriormente equilibrada com tampão fosfato de sódio e potássio 5 mM, pH 6,8.

A amostra (10 mg em 1 ml) foi aplicada à coluna e eluída inicialmente com o tampão de equilíbrio, seguido de tampão fosfato 5 mM pH 6,8 com NaCl 1 M. Foram coletadas frações de 3,6 ml a um fluxo constante de 30 ml/h. Os sistemas coletor e analisador usados foram os mesmos descritos no ítem 3.8. Foram feitas determinações de proteína e atividade hemaglutinante nas frações pelo método descrito anteriormente (ítem 3.4).

3.11 - Cromatografia da Fração PIII em Coluna de CM-celulose

Para os experimentos cromatográficos de troca iônica em CM-celulose, foi utilizada uma coluna medindo 11,1 x 1,2 cm onde o gel foi sedimentado por gravidade, após uma lavagem sucessiva com água, HCl 0,1M, água, NaOH 0,1M e água, eliminando assim as partículas finas (PETERSON e SOBER 1962).

A coluna foi então equilibrada com tampão fosfato de sódio e potássio 5 mM, pH 6,8 e a amostra (10 mg em 1 ml) aplicada, sendo eluída inicialmente com o mesmo tampão de equilíbrio, seguido de um gradiente linear de NaCl de 0 a 1 M (200ml), preparado no tampão inicial. O fluxo foi mantido em 30 ml/h, sendo recolhidas frações de 3,6 ml, que foram usadas para determinações de proteína e atividade hemaglutinante.

3.12 - Preparação de Anti-soro Anti-Extrato Total

A sensibilização primária de coelho (albino, adulto) foi feita por via intramuscular com 10 mg de Extrato Total

dissolvidos em 1 ml de uma mistura de NaCl 1 M mais adjuvante completo de Freud (1:1). Após 15 dias foi dado o primeiro reforço usando-se 10 mg de amostra dissolvidos em 1 ml de NaCl 0,15M e injetados por via subcutânea no dorso do animal. Decorridos mais 15 dias, foi dado um segundo reforço nas mesmas condições e após 7 dias foi feita a primeira sangria. Após coagulação, o soro foi separado dos elementos sólidos ainda presentes por centrifugação e armazenado em congelador (20°C). Reforços e sangrias adicionais foram feitos para a obtenção da quantidade desejada de soro com título apropriado de anticorpos. O soro assim obtido, foi então, dialisado contra água, liofilizado e armazenado, a frio, (7°C) em frascos hermeticamente fechados.

3.13 - Preparação de IgG anti-PIII de Dioclea grandiflora

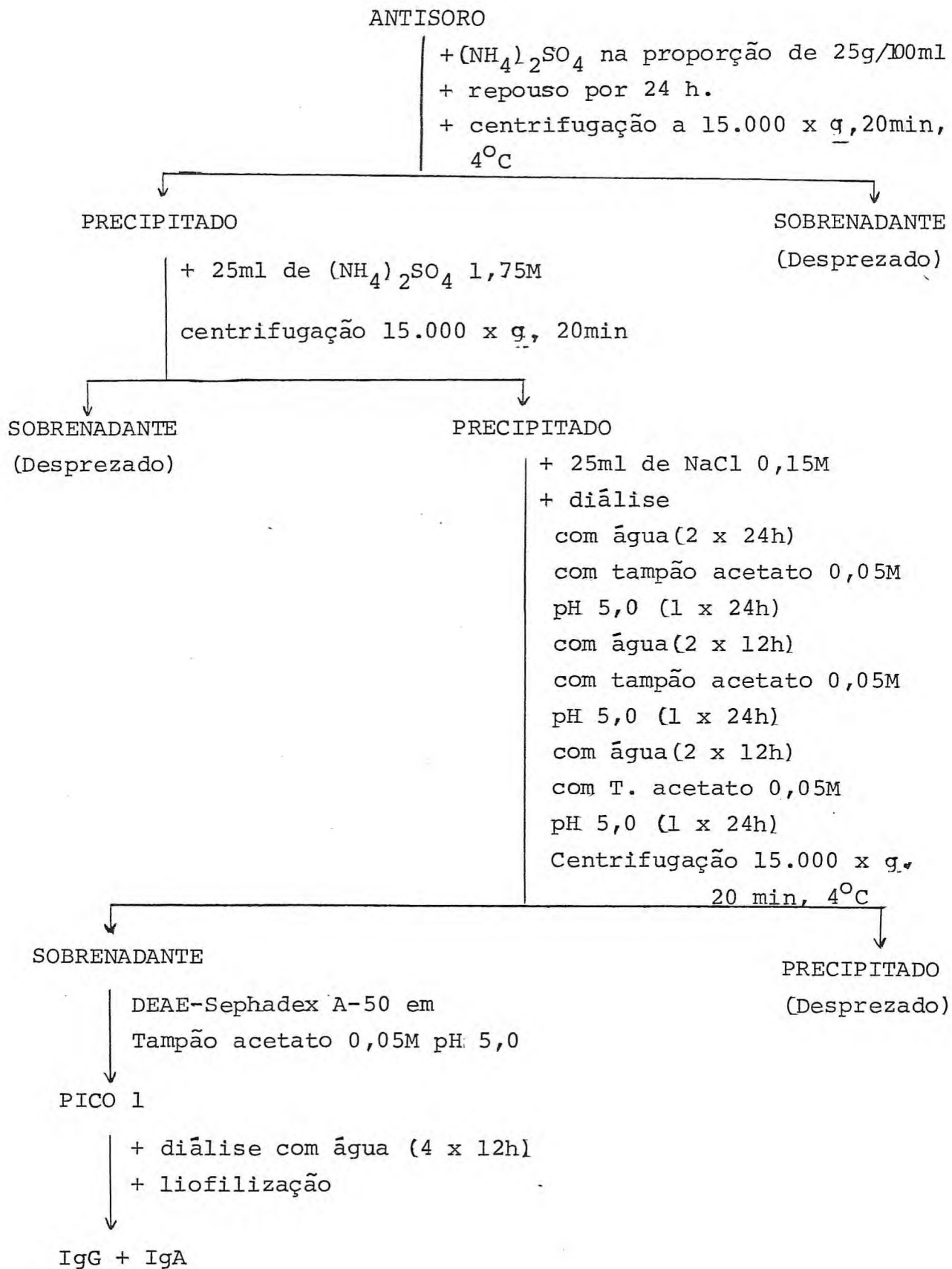
Soro (coelho) anti-PIII foi obtido como já descrito no item 3.12, utilizando-se 2 mg de PIII em cada sensibilização.

O soro não dializado, foi utilizado para o isolamento de IgG, através de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia em DEAE-Sephadex A-50 segundo HARBOE e INGLID (1973) (FIGURA 1).

Uma coluna de DEAE-Sephadex A-50, medindo 48 x 1,5 cm, foi preparada conforme instruções do fabricante e o gel equilibrado com tampão acetato 0,05M pH 5,0. A fração de soro precipitada com 40% de saturação de sulfato de amônio (a partir de 80 ml de soro) foi aplicada e eluída com o tampão de equilíbrio, a um fluxo de 30 ml/h. Os sistemas coletor e analisador foram os mesmos usados nas cromatografias anteriores.

3.14 - Imunodifusão

Foi utilizada a técnica de imunodifusão dupla em gel de



agar desenvolvida por OUCHTERLONY e descrita por CLAUSEN (1969).

Gel de agar a 1% preparado em água destilada contendo 0,04% de azida sódica, foi diluído 2 vezes em NaCl 1,8% e montado em placas de vidro medindo 8 x 9 cm. Após a solidificação, foi feito um orifício central e orifícios radiais equidistantes.

As amostras dissolvidas em NaCl 0,9% na concentração de 2,0 mg/ml, foram aplicadas nos orifícios radiais e deixadas difundir em câmara úmida contra o anti-soro aplicado no orifício central, por pelo menos 16 horas, de modo a permitir reações de precipitação. Após a formação dos arcos de precipitação, o gel foi seco sob uma lâmpada. A placa seca foi então deixada imersa em NaCl 0,9% por aproximadamente 16 horas coradas com Coomassie Brilliant Blue 0,5% por 15 minutos e descoradas com a mesma solução descorante usada nos experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida. (ítem 3.9)

3.15 - Cromatografia da Fração PIII em Biogel P-100 a Diferentes Valores de pH

Foi utilizada para estes experimentos, uma coluna de Biogel P-100, medindo 82 x 1,6 cm. O gel foi deixado entumescer em água destilada por pelo menos 24 horas e a coluna montada deixando-se o mesmo sedimentar por gravidade.

A coluna foi calibrada com Blue dextran, albumina sérica bovina, ovalbumina, quimiotripsina e citocromo c, em tampão tris-acetato 0,05M pH 8,0 com NaCl 0,1M.

Amostras de PIII (obtidas por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50) foram cromatografadas a diferentes valores de pH, utilizando-se as seguintes soluções tampões: a) tampão borato 0,05M pH 10; b) tampão borato 0,05M pH 9,0; c) tampão tris-acetato 0,05M pH 8,0; d) tampão fosfato

0,05M pH 6,0; e) tampão acetato 0,05M pH 5,0; f) tampão acetato 0,05M pH 4,0 e g) tampão glicina-HCl 0,05M pH 2,0. Todos os tampões continham NaCl 0,1M. A eluição das amostras foi feita a um fluxo de 10 ml/h e o efluente recolhido em frações de 1,7 ml. O sistema de coleta e a determinação do teor de proteína das frações foram os mesmos já descritos no item 3.8.

3.16 - Cromatografia da Fração PIII em Sephadex G-50 a Diferentes Valores de pH

As amostras de PIII foram dissolvidas em tampões com diferentes valores de pH e aplicadas em uma coluna (26,5x1,5 cm) de Sephadex G-50 equilibrada previamente com o tampão de eluição. A eluição foi feita inicialmente com o tampão de equilíbrio (68 ml) seguido por tampão glicina-HCl 0,1M pH 2,5 contendo NaCl 1M, CaCl₂ 5mM e MnCl₂ 5mM. Foram utilizadas as seguintes soluções tampões: a) tampão borato 0,1M pH 10; b) tampão borato 0,1M pH 9,0; c) tampão tris-acetato 0,1M pH 8,0; d) tampão tris-acetato 0,1M pH 6,0; e) tampão acetato 0,1M pH 5,0; f) tampão acetato 0,1M pH 4,0 e g) tampão glicina-HCl 0,1M pH 3,0. Todos os tampões continham NaCl 1M, CaCl₂ 5mM e MnCl₂ 5mM. Frações de 1,7 ml foram coletadas a um fluxo de 21 ml/h. Os sistemas de coleta e determinação, do teor de proteína das frações foram os mesmos já descritos no item 3.8.

3.17 - Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante por Açúcares Simples

Para os ensaios de inibição, amostras de PIII (0,4mg/ml) em NaCl 0,15M contendo CaCl₂ 5mM e MnCl₂ 5mM, foram diluídas com a mesma solução, em placas de microtitulação com o auxílio de microdiluidores da mesma maneira já citada no item 3.4. Em

seguida foi colocada em cada poço uma gota (Ca. 25 ul) da solução 0,1M do açúcar problema, e a mistura deixada em repouso por 30 min à temperatura ambiente, para permitir a interação entre as lectinas e o açúcar. Após este tempo hemácias de coelho a 2%, também em NaCl 0,15M, CaCl₂ 5mM e MnCl₂ 5mM, foram adicionadas aos poços e as placas incubadas a 37°C por 30 minutos e a temperatura ambiente por mais 30 min. Os títulos foram então determinados com o auxílio do microscópio.

3.18 - Espectro de Absorção da Fração PIII

Para determinação do espectro de absorção da fração PIII, foram feitas soluções de lectina (0,5mg/ml) em soluções tampões com diferentes valores de pH. Foram utilizadas as seguintes soluções tampões: a) tampão borato 0,1M pH 10; b) tampão borato 0,1M pH 9,0; c) tampão tris-acetato 0,1M pH 8,0; d) tampão fosfato 0,1M pH 7,0; e) tampão tris-acetato 0,1M pH 6,0; f) tampão acetato 0,1M pH 5,0; g) tampão acetato 0,1M pH 4,0; h) tampão glicina-HCl 0,1M pH 3,0; i) tampão glicina-HCl 0,1M pH 2,0. Todos os tampões continham NaCl 0,15M.

Os espectros foram determinados em um espectrofotômetro Varian de duplo feixe com cubetas de quartzo de 1cm de caminho ótico. O teor de proteína das amostras foi calculado pelo método do microbiureto.

3.19 - Composição Química

A determinação da composição de aminoácidos foi feita pelo método de MOORE et al., (1958). Cisteína e metionina foram determinadas pelo método de MOORE (1963) e tirosina e triptofano pelo método espectrofotométrico de BENCE e SCHIMIDT

(1957).

O teor de açúcar em amostras de PIII (5mg/ml) foi deter
minado pelo método de DUBOIS (1956).

4 - RESULTADOS

4.1 - Caracterização da Semente de Dioclea grandiflora Mart.

A semente de Dioclea grandiflora Mart., presente normalmente em número de 5 a 7 em vagens longas medindo até 30 x 6cm, é caracterizada por apresentar uma cor marron, forma arredondada, e peso médio de 10g, sendo 90% do peso constituído pela amêndoa (FIGURA 2).

Pelos dados de composição mínima (TABELA 2) é observado que as amêndoas de Dioclea grandiflora são praticamente desprovidas de lipídios possuindo um teor de proteína de 26%.

4.2 - Efeito do pH na Extração da Atividade hemaglutinante de Dioclea grandiflora Mart.

Os resultados obtidos quando a farinha de Dioclea grandiflora foi submetida a extração a diferentes valores de pH são apresentados nas TABELA 3 e FIGURA 3, onde podemos observar uma solubilidade acentuada das proteínas a pH 2 (158 mg/g da farinha) seguida de um decréscimo, atingindo um mínimo a pH 4 (102 mg/g) voltando a subir para alcançar o valor de 186 mg/g a pH 8 permanecendo praticamente estável até pH 10. A atividade de hemaglutinante foi melhor extraída na região entre pH 3 e 5, sendo que a maior atividade específica é obtida a pH 4.

4.3 - Extração da Lectina a pH 5,0 (Extrato Total)

Apesar de se obter uma maior atividade específica a pH



TABELA 2 - Composição mínima de sementes de D.grandiflora com base no peso seco e expressa em porcentagem.

Constituinte	Teor na amostra
Umidade	9,8
Proteína bruta *	26,09
Lipídios	2,69
Glicídios **	68,38
Cinza	2,84

* Nitrogênio Total X 6,25

** Obtido por Diferença

FIGURA 3 - Efeito do pH sobre a extração das proteínas e atividade hemaglutinante da semente de mucunã.

(O—O) Proteína (mg/g farinha)

(●—●) U.H/g farinha

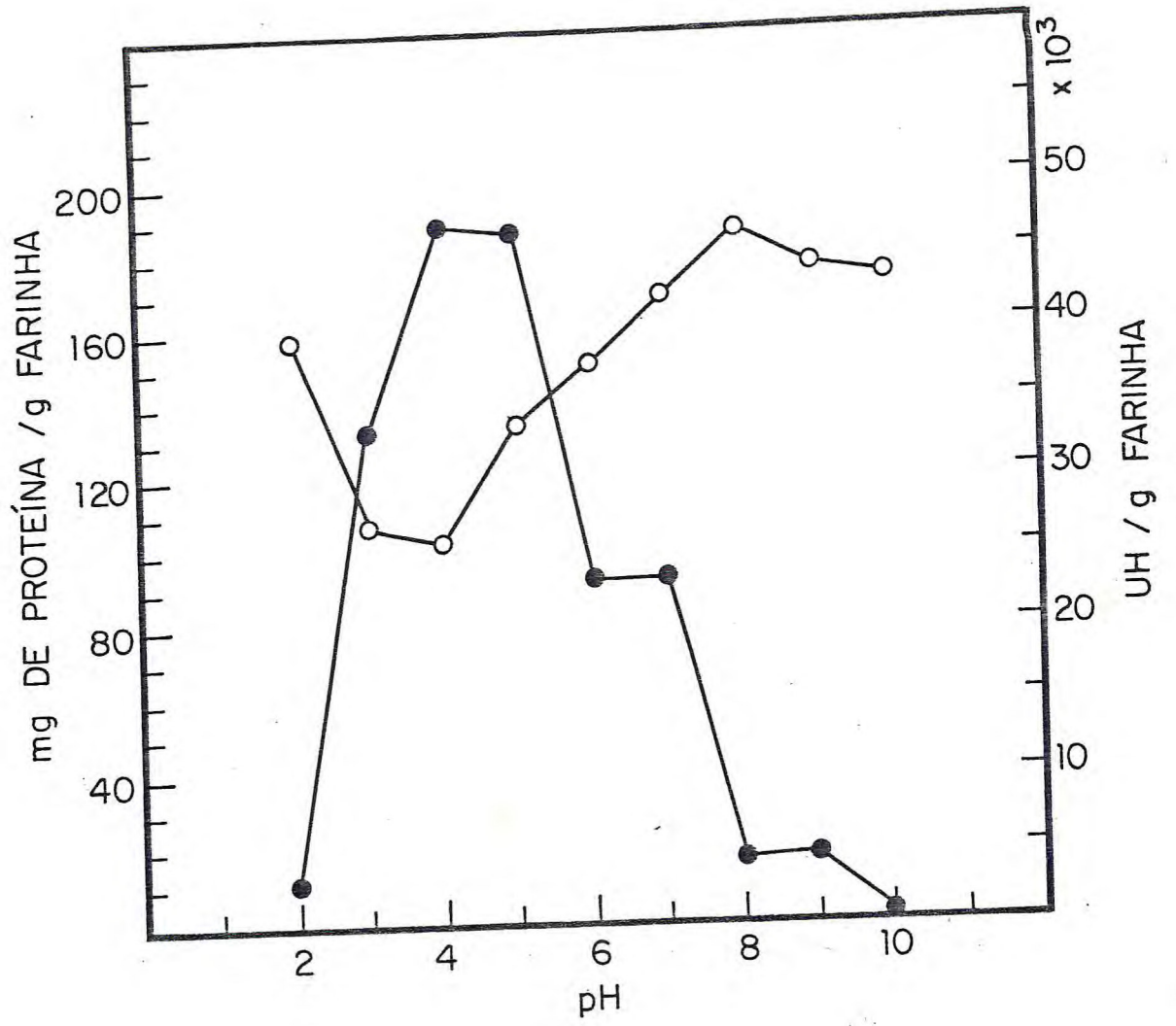


TABELA 3 - Extração das proteínas e atividade hemaglutinante de semente de Dioclea grandiflora a diferentes valores de pH.

pH *	Proteína extraída (mg/g de farinha)	Atividade hemaglutinante	
		UH/mg proteína	UH/g farinha (x 10 ³)
2.0	158	18	2,84
3.0	107	309	33,06
4.0	102	461	47,02
5.0	133	352	46,82
6.0	150	154	23,10
7.0	168	138	23,18
8.0	186	22	4,09
9.0	176	24	4,22
10.0	173	1	0,17

* Meio de extração: NaCl 0,15M com pH ajustado com HCl e NaOH

4 foi escolhido o pH 5, que apresenta a mesma atividade por grama de farinha, para extração devido ao fato de nesse pH o extrato se apresentar mais límpido. Quando a farinha de mucunã de caroço foi submetida a extração com tampão acetato 0,1M pH 5,0 contendo NaCl 0,15M, foi obtido um extrato contendo 129 mg de proteína por g de farinha e uma atividade específica de 529 UH/mg.

4.4 - Fracionamento do Extrato Total por Precipitação com Sulfato de Amônio

O Extrato Total obtido por extração com tampão acetato pH 5,0 foi submetido a fracionamento com sulfato de amônio seguindo-se o esquema mostrado na FIGURA 4. Os resultados obtidos são apresentados na TABELA 4, onde se observa que embora apenas 46,4% da proteína recuperada seja precipitada entre 50 e 70% de saturação de sulfato de amônio, 79% da atividade hema-glutinante recuperada é precipitada nesta faixa. Foi notada uma perda de 35,2% do teor de proteína, o que pode ser explicado pela diálise a que as frações são submetidas após a precipitação com sulfato de amônio. A atividade hemaglutinante por outro lado, é 21% mais elevada, o que nos leva a acreditar na presença de algum inibidor de peso molecular baixo, que seria eliminado por diálise.

4.5 - Efeito dos Cátions Ca^{2+} e Mn^{2+} sobre a Atividade Hemaglutinante

O efeito dos cátions divalentes Mn^{2+} e Ca^{2+} sobre a atividade hemaglutinante foi testado utilizando-se como amostra Extrato Total a pH 5,0. Os resultados obtidos são mostrados na TABELA 5, onde se nota que a atividade máxima é encontrada a 3mM. Foi

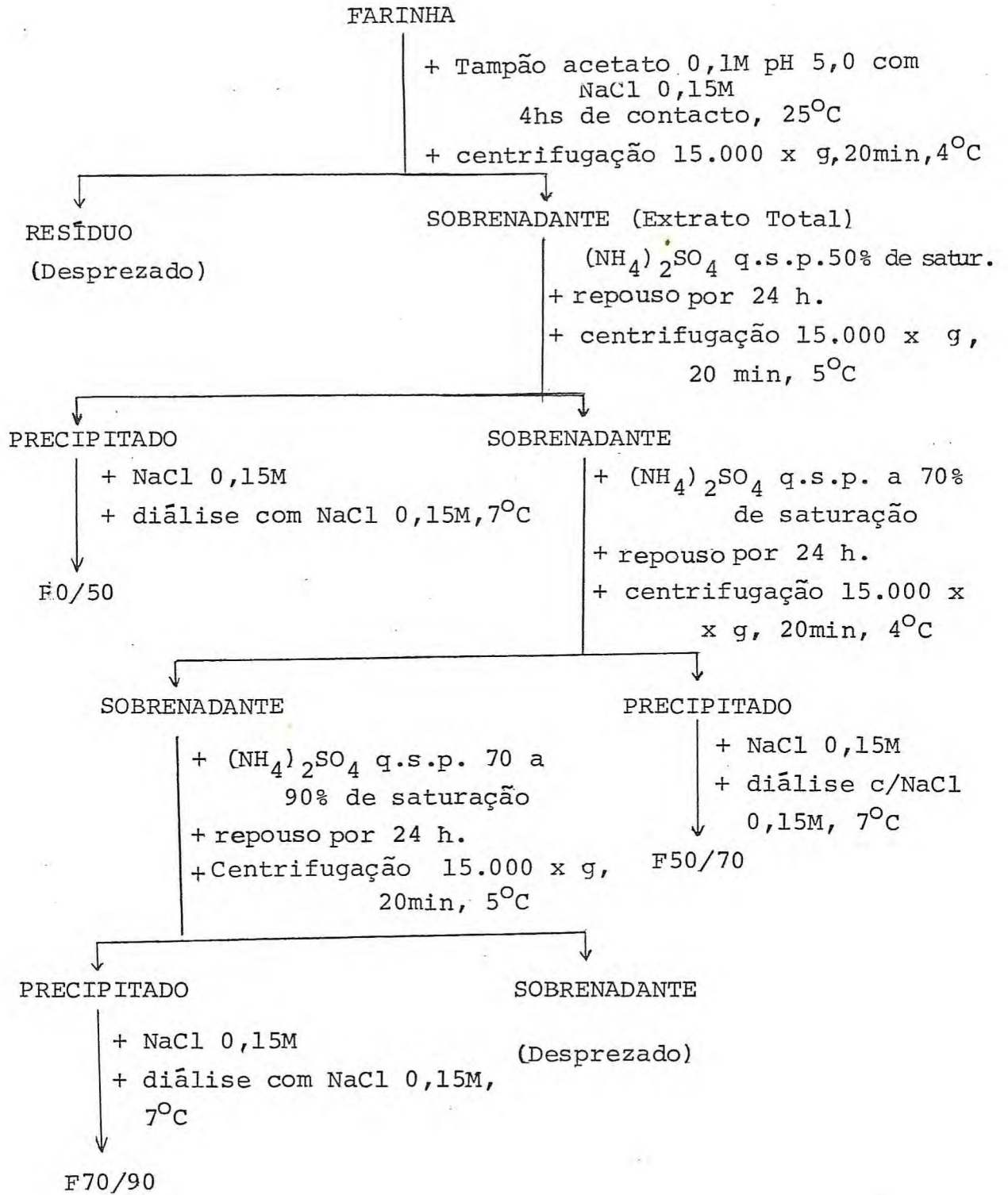


TABELA 4 - Teor de proteína e atividade hemaglutinante no Extrato Total e nas frações obtidas por precipitação com sulfato de amônio.

Intervalo de saturação (%)	Teor de Proteína		Atividade hemaglutinante		
	mg/g de farinha	% de proteína recuperada*	UH/mg de proteína	UH/g de farinha	% da atividade recuperada*
Extrato Total	98,80		80	7904	
F0/50	18,31	28,6	100	1831	19,1
F50/70	29,70	46,4	256	7603	79,2
F70/90	15,99	24,0	10	160	1,7

* Calculado considerando como 100% a soma do teor de proteína ou atividade precipitada por sulfato de amônio.

TABELA 5 - Efeito dos Cations Ca^{2+} e Mn^{2+} na atividade hema
glutinante.

Concentração final de Ca^{++} e Mn^{++}	Atividade hemaglutinante UH/ml
0	2048
1	2048
3	8192
5	4096
7,5	3072
10	2048
15	2048
20	2048

observado também que a baixas concentrações de cátions, e visualização da aglutinação era difícil, obtendo-se títulos mais repetitivos a partir de 5mM. Este valor foi então escolhido para os ensaios de hemaglutinação durante todo o processo de fracionamento.

4.6 - Cromatografia de Afinidade da Fração F50/70 em Coluna de Sephadex G-50

Os resultados obtidos quando a fração F50/70 dissolvida em NaCl 1M contendo CaCl_2 5mM e MnCl_2 5mM foi submetida a fracionamento em uma coluna de Sephadex G-50, previamente equilibrada com a mesma solução, são mostrados na FIGURA 5. Foram obtidos 3 picos, dois dos quais eluídos com a solução de equilíbrio e um terceiro (PIII) que contém praticamente toda a atividade hemaglutinante (99,8%), eluído com uma solução tampão Glicina-HCl 0,1M pH 3,0 com NaCl 1M, CaCl_2 5mM e MnCl_2 5mM.

Resultado semelhante é obtido quando Glicose 0,1M contendo NaCl 1M, CaCl_2 5mM e MnCl_2 5mM, é utilizado em lugar do tampão Glicina pH 3,0. A eluição com Glicose, no entanto, traz problemas pois se a fração PIII não for dialisada exaustivamente, pode restar glicose (um forte inibidor da lectina) no meio, prejudicando as dosagens de atividade, determinação de composição química e efeitos tóxicos.

A fração PIII após diálise contra água e liofilização, foi então utilizada para experimentos de caracterização de pureza e determinação de algumas propriedades químicas físicoquímicas e biológicas. Os dados referentes a recuperação e purificação estão relacionados na TABELA 6.

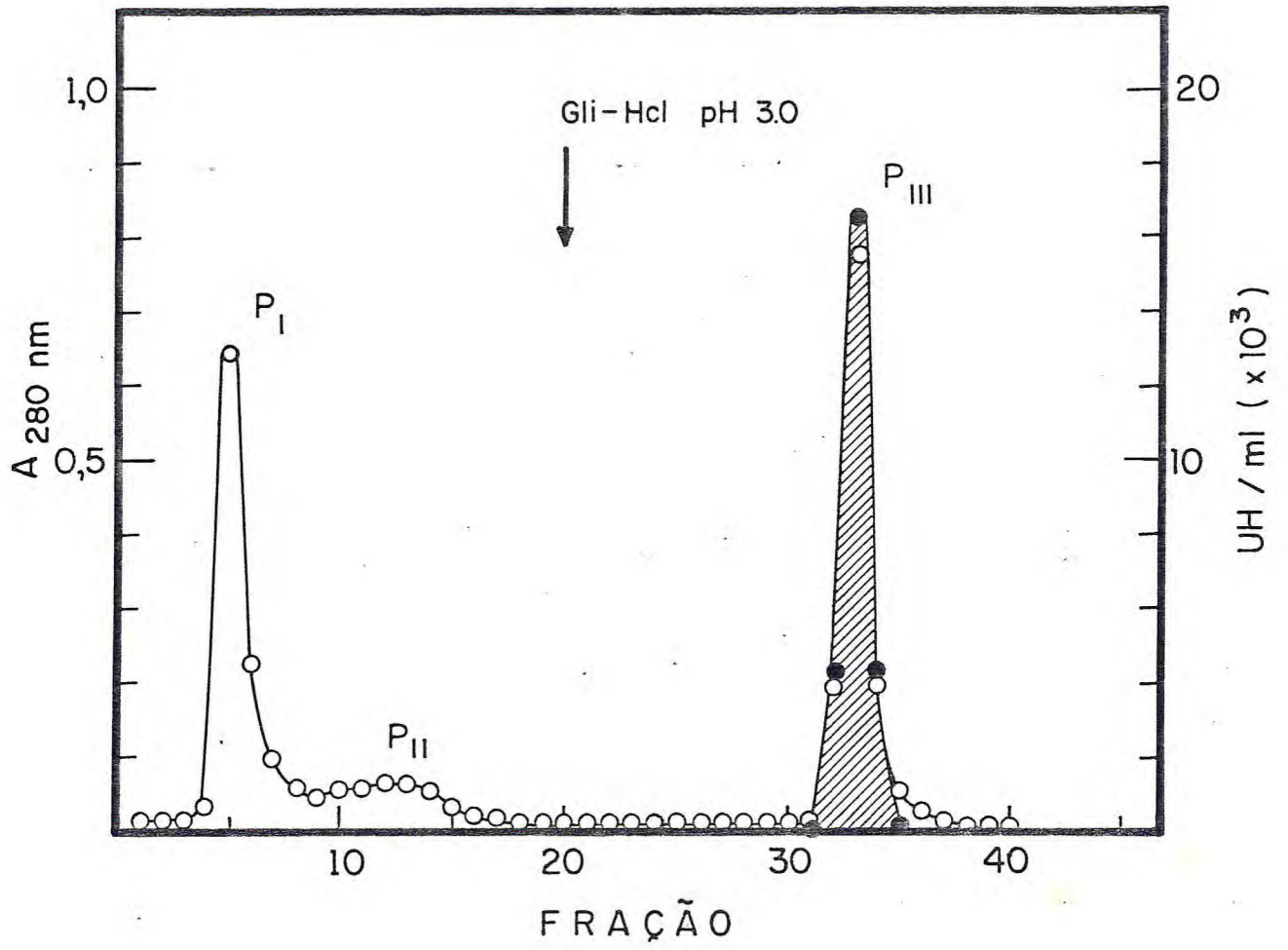


TABELA 6 - Total de proteína e atividade hemaglutinante de sementes de Dioclea grandiflora recuperadas nos diversos estágios de purificação.

Frações	Quantidade (g)	UH/mg	UH Total x 10 ⁻⁵	Purifi- cação (X)
Farinha	100	8	8,0	1
Extrato Total	9,88	80	7,9	10
F50/70	2,97	256	7,6	32
PIII (Sephadex G-50)	1,42	768	10,9	96
P ₂ (Biogel P-100)	1,21	768	9,3	96

4.7 - Cromatografia da Fração PIII em Coluna de DEAE-celulose

A fração PIII, quando aplicada à coluna de DEAE-celulose foi eluída com o tampão de partida, em um único pico, não havendo proteína retida (FIGURA 6).

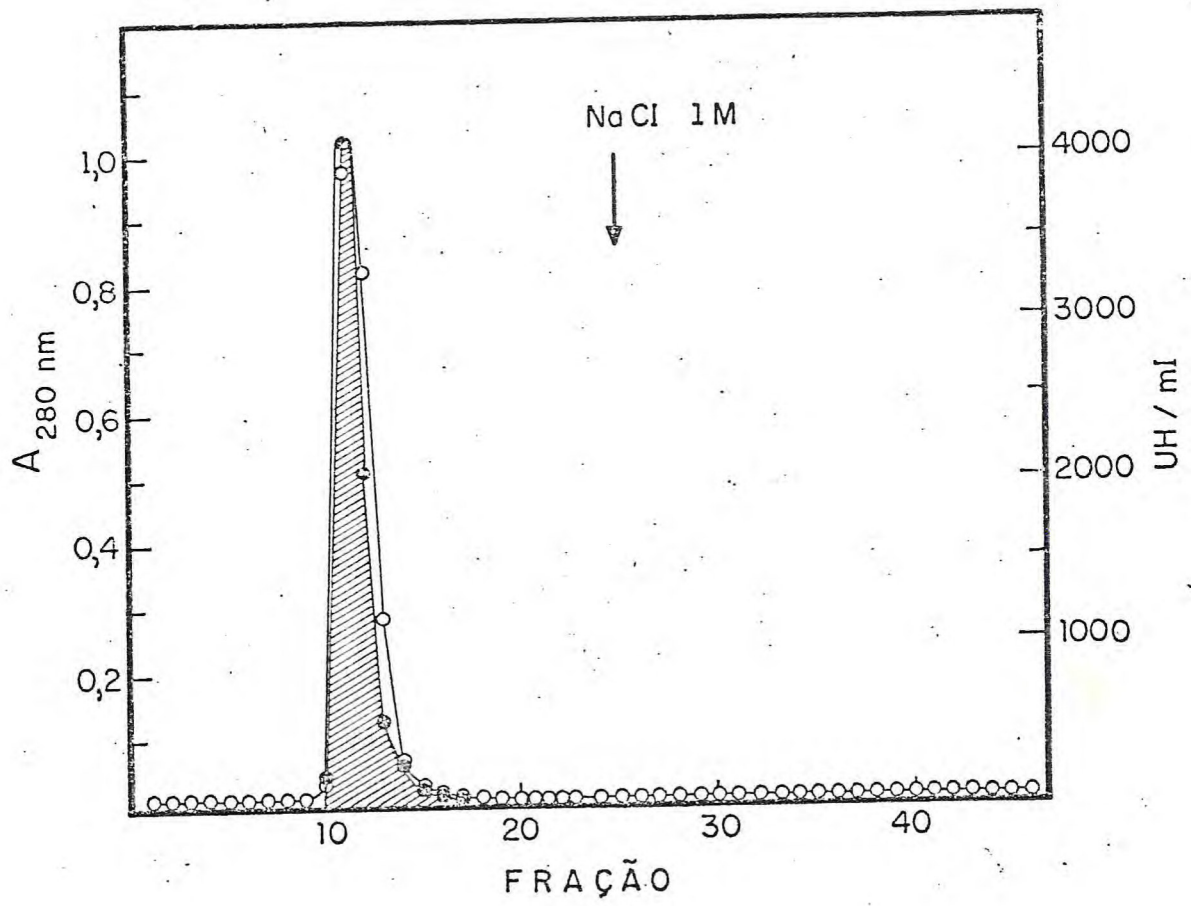
4.8 - Cromatografia da Fração PIII em Coluna de CM-celulose

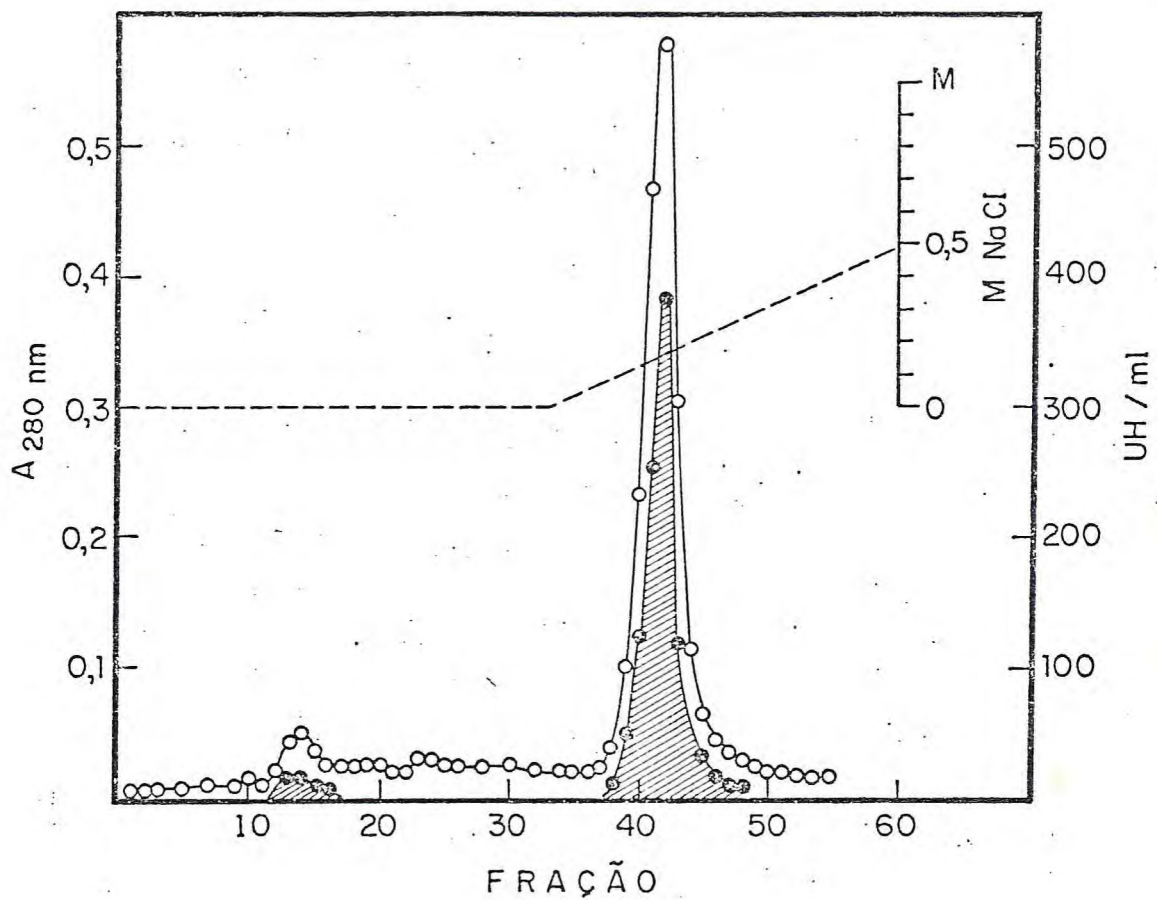
Diante dos resultados da cromatografia anterior, a fração PIII foi submetida a cromatografia em coluna de CM-celulose com o objetivo de verificar a existência de mais de uma fração. Pela FIGURA 7 podemos observar que apenas 3,6% da proteína foi eluída com o tampão de partida, sendo que 96,4% da proteína ficou retida, sendo eluída em um único pico a uma concentração de NaCl de 0,16M. Ambos os picos apresentaram atividade hemaglutinante.

4.9 - Imunodifusão Dupla de Ouchterlony

As frações, Extrato Total, F70/90, PI e PIII, foram submetidas a imunodifusão dupla em gel de agar, utilizando anti-soro anti-Extrato Total e IgG de coelho monoespecífica anti-PIII.

Podemos observar pelos resultados (FIGURA 8B) que a fração PIII se mostrou homogênea, dando um único arco de precipitação, e que a IgG monoespecífica reconhece apenas uma única fração no Extrato Total, não ocorrendo reação de precipitação entre as outras frações e a IgG monoespecífica. Podemos observar ainda, que a fração do Extrato Total reconhecida pela IgG dá uma reação de identidade total com o PIII. Quando o anti-soro anti-Extrato Total foi usado (FIGURA 8A), o Extra







A



B

to Total apresentou 5 arcos embora o PIII continue apresentando apenas um arco.

4.10 - Cromatografia da Fração PIII em Coluna de Biogel P-100 a Diferentes Valores de pH

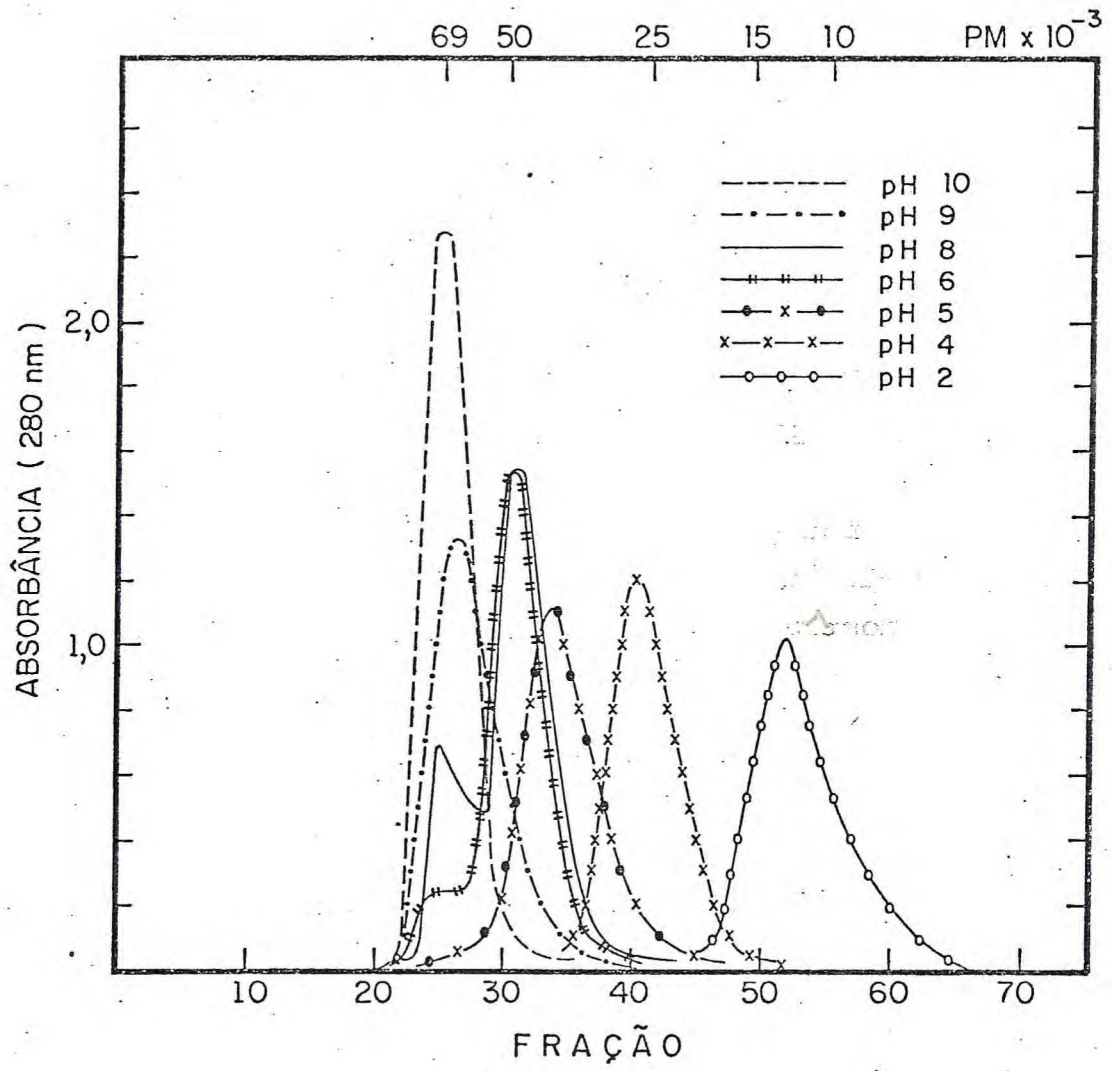
A fração PIII foi submetida a cromatografia de exclusão molecular em coluna de Biogel P-100 a diferentes valores de pH. A coluna foi inicialmente equilibrada com solução de Blue dextran, albumina sérica bovina, ovalbumina, quimiotripsina e citocromo c em tampão tris-acetato 0,05M pH 8,0 contendo NaCl 0,15M. Com os dados obtidos foi calculada a equação $\log PM = 5,54 - 0,70 Ve/Vo$ para a coluna.

Quando uma amostra de PIII, dissolvida no tampão de calibração, foi submetida ao mesmo sistema foram obtidos dois picos (FIGURA 9): P_1 , correspondendo a 24,2% do total, com peso molecular de 69000 daltons e P_2 , responsável por 75,8% da proteína total, apresentando um peso molecular de 47000 daltons. Ambas as frações apresentaram a mesma atividade hemaglutinante. A fração P_2 foi então utilizada para os estudos de composição mínima e determinação de peso molecular por equilíbrio de sedimentação.

Quando amostras de PIII foram dissolvidas em soluções tampões a diferentes valores de pH, foi observado (FIGURA 9) que em pHs mais elevados (9,0 e 10) toda a proteína concentrava em um único pico ($PM \gg 69.200$). Por outro lado, a medida que eram usadas soluções tampões progressivamente mais ácidas, o teor de proteínas na fração P_1 ia diminuindo e aparecendo um único pico com pesos moleculares progressivamente mais baixos.

Os resultados acima parecem indicar a presença de um sistema de agregação com a formação de moléculas de peso molecular elevado a pHs acima de 6,0. O valor obtido a pH 2,0 (12.000),

FIGURA 9 - Cromatografia da fração PIII em coluna de Biogel P-100 a diferentes valores de pH.
Amostra: 20mg em 1 ml, Fluxo: 10 ml/h, Frações :
1,7 ml.



no entanto, parece indicar além de uma diminuição no peso molecular, a presença também de uma interação da fração mais forte com o gel.

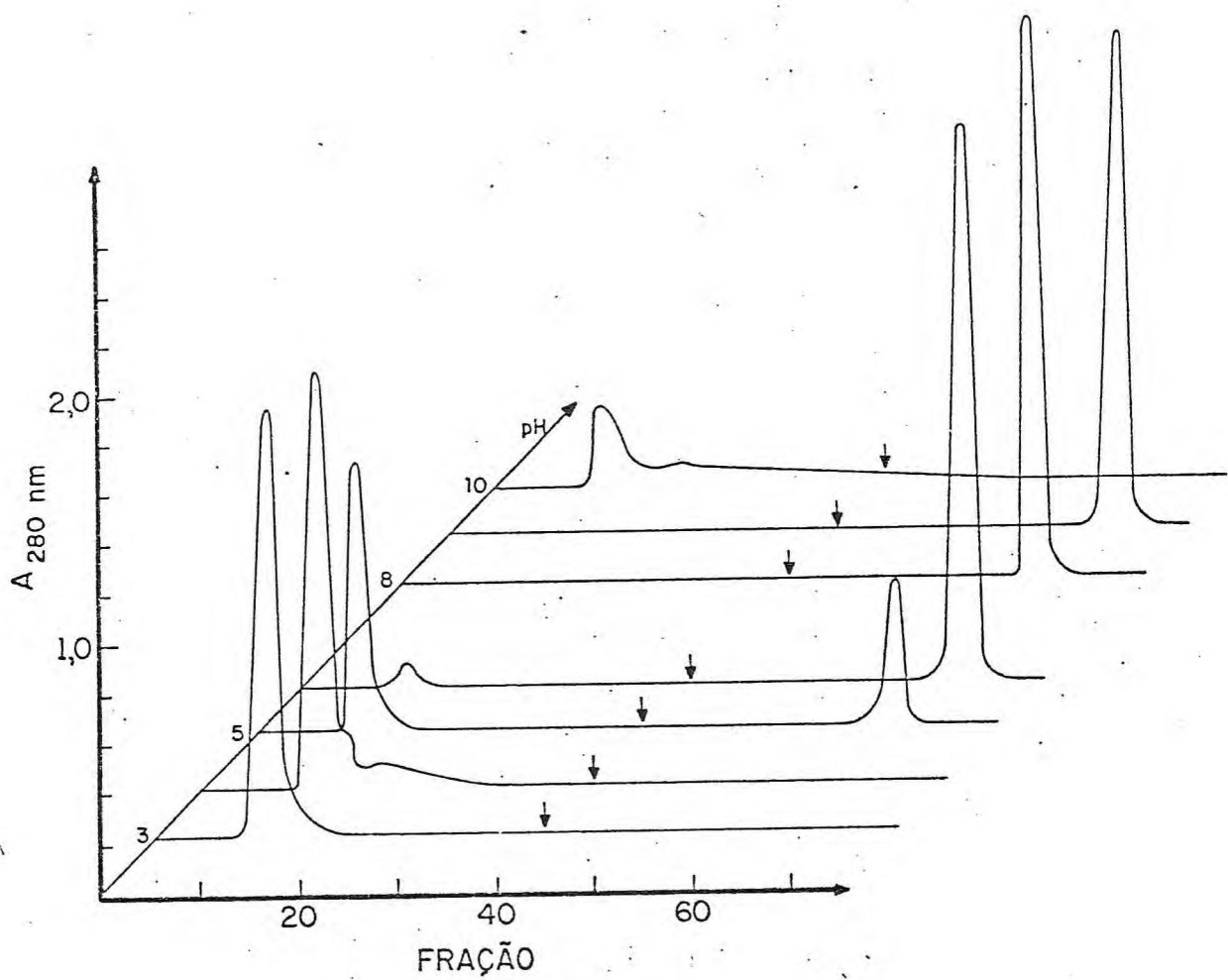
4.11 - Cromatografia da Fração PIII em Coluna de Sephadex G-50 a Diferentes Valores de pH.

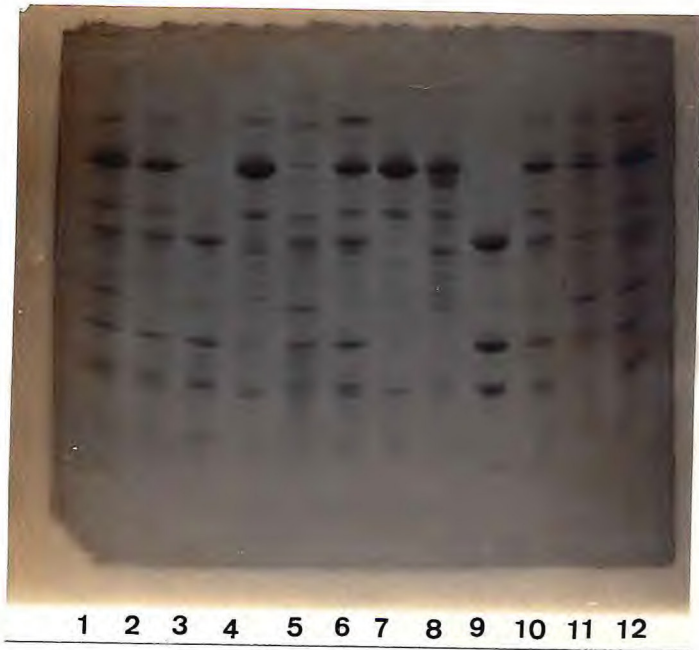
Como a lectina de Dioclea grandiflora possui a propriedade de interagir com Sephadex, o efeito do pH sobre esta atividade foi testado através de cromatografia em coluna de Sephadex G-50. Dos resultados obtidos (FIGURA 10) foi observado que a interação lectina-Sephadex é fortemente dependente do pH do meio, havendo uma diminuição progressiva da afinidade a medida que o pH é abaixado. A lectina só ficou completamente retida entre pH 6,0 e pH 9,0.

4.12 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS e Beta-mercaptoetanol.

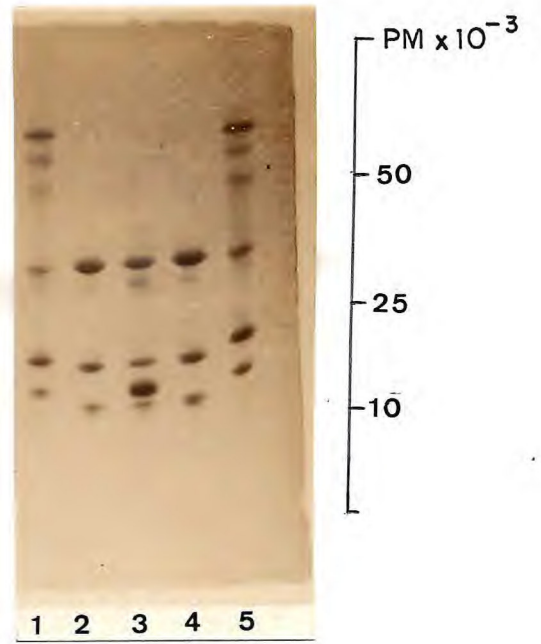
A FIGURA 11 mostra os resultados obtidos quando a farinha total, o resíduo e as diversas frações protéicas de Dioclea grandiflora tratadas com SDS e beta-mercaptoetanol foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS. Foram observadas três bandas na fração PIII, correspondendo a pesos moleculares de 25-26000, 13-14000 e 8-9000 daltons; as mesmas bandas são encontradas em todas as frações ativas.

Experimentos realizados com a fração PIII não tratada previamente com beta-mercaptoetanol, mostraram os mesmos resultados indicando que a dissociação da lectina nas três subunidades independe da quebra de pontes S-S.





A



B

4.13 - Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante da Fração PIII.

A atividade hemaglutinante da fração PIII é inibida em intensidade variável por açúcares simples. A TABELA 7 mostra a concentração mínima de PIII capaz de aglutinar hemácias de coelho na presença de soluções 0,1M de diferentes açúcares. Podemos ver que a manose se mostra mais potente em inibir a atividade. Manose é capaz de inibir 98%, frutose 96,3% e glicose 67,6% da atividade hemaglutinante obtida na ausência de açúcar. A presença de galactose não interfere na atividade hemaglutinante da lectina.

4.14 - Espectros de Absorção.

O PIII apresentou um valor de $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 12,0$ a 280 nm quando dissolvida em NaCl 0,15M, pH 7,0 (FIGURA 12).

Foram também determinados os espectros da fração PIII a valores de pH variando de 2 a 10. Não foram notados alterações que indicassem mudança de estrutura.

4.15 - Composição Química.

O teor de carboidratos da lectina de Dioclea gradiflora, determinado pelo método de DUBOIS (1956) foi extremamente baixo, abaixo da sensibilidade do método, mesmo a uma concentração 0,5% de proteína.

A composição de aminoácidos (TABELA 8) é caracterizada pela ausência total de cisteína, baixo teor de metionina e uma

TABELA 7 - Inibição da atividade hemaglutinante da fração PIII por açúcares simples.

Açúcar (0,1M)	Concentração mínima de * PIII (µg/ml)
—	1,29
Galactose	1,30
Glicose	3,99
Frutose	34,70
Manose	64,65

* Concentração mínima de lectina ainda capaz de aglutinar hemácias de coelho a 2%.

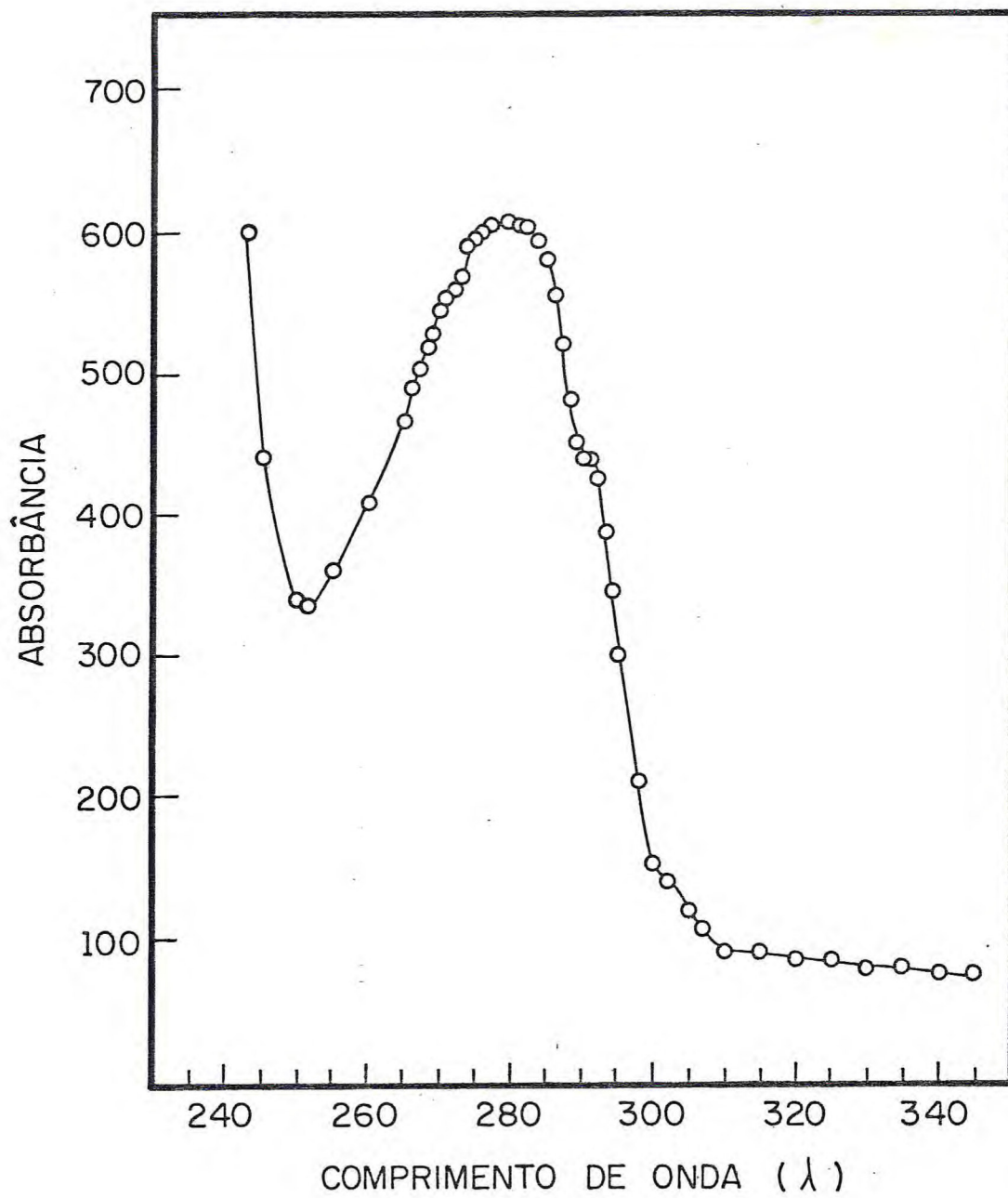


TABELA 8 - Composição de aminoácido da lectina de Dioclea grandiflora

Os valores são dados em g de aminoácido anidro por 100g de proteínas (P₂)

Lis	4,93
His	2,18
Arg	3,42
Asp	13,48
Thr	6,26
Ser	9,23
Glu	5,17
Pro	4,24
Gli	3,09
Ala	3,80
Val	3,49
Met**	0,44
Ile	4,17
Leu	6,52
Tir	3,85
Fen	5,63
Tri**	4,50
Cis*	ZERO
Total	84,60

* Determinados depois da oxidação com ácido perfórmico

** Determinados espectrofotometricamente

concentração elevada de serina e dos ácidos aspártico e glutâmico.

5 - DISCUSSÃO

A extração da lectina de Dioclea grandiflora Mart. foi mais eficiente na região de pH 3,0 a 5,0, com atividades específicas mais elevadas entre pH 4,0 a 5,0 onde, por outro lado, o teor de proteínas totais extraídas apresentou-se mais baixo. Por extração com tampão acetato 0,1M pH 5,0, contendo NaCl 0,15M, foi obtido um extrato contendo 129 mg de proteína por grama de farinha, com uma recuperação de 49% em relação à proteína total obtida pelo método de Kjeldahl.

A precipitação por sulfato de amônio, como uma primeira etapa de purificação, se apresentou como método bastante eficiente pois, ao mesmo tempo que precipitou na faixa de 50-70% de saturação, 46,4% de proteína recuperada, concentrou na mesma faixa 79% da atividade hemaglutinante recuperada, com uma purificação de 32 vezes. Foi verificada uma perda de proteína por diálise e ainda um aumento de atividade hemaglutinante, devido provavelmente à eliminação, por diálise, de algum inibidor de peso molecular baixo. O mesmo parece ocorrer em sementes de Dioclea sclerocarpa, que apresenta uma substância dialisável, capaz de inibir a atividade hemaglutinante (MOREIRA e PUSZTAI, 1982) e com a lectina de Canavalia brasiliensis (CAVADA, 1980).

Algumas das propriedades da lectina de Dioclea grandiflora são muito semelhantes àquelas de concaivalina A, lectina de Canavalia ensiformis. Assim é que essas proteínas não contêm carboidratos em sua estrutura não sendo portanto glicoproteínas; são relativamente ricas em ácido aspártico, serina e treonina e caracterizadas por ausência total de cisteína. Isto é característico de proteínas de plantas e está de acordo com a composição de aminoácidos da maioria das lectinas, embora as lectinas de germe de trigo e batata sejam ricas em cisteína (LIS e SHARON, 1981).

Pelo teor de ácido aspártico e ácido glutâmico (18,6%) e dos aminoácidos básicos, lisina, arginina e histidina (10,5%), o pI da lectina de Dioclea grandiflora deveria estar na zona ácida. MOREIRA e colaboradores (1982) mostraram, no entanto, que a lectina de Dioclea grandiflora na realidade é composta por uma família de isolectinas apresentando, por eletrofocalização em gel de poliacrilamida, 5 bandas de proteínas com pI entre 8,6 e 9,0. Uma explicação para essa discrepância é que provavelmente parte desses resíduos estariam sob a forma de asparagina e glutamina.

A lectina de Dioclea grandiflora mostra uma especificidade por resíduos de manose e glicose e nenhuma especificidade por galactose, o que está de acordo com MAKELA (1957). O grupo hidroxila 4 estaria envolvido na ligação com lectinas e assim, lectinas que fixam manose e glicose não interagem com galactose e vice-versa. Neste aspecto, poderia ser classificada no mesmo grupo das lectinas isoladas de Canavalia ensiformis, Lens culinaris, Pisum sativum e Vicia faba (GOLDSTEIN, I. J. e HAYES, 1978).

SILVA LIMA e colaboradores (1981), mostraram que a degranulação de mastócitos induzida por PIII também era inibida por glicose, frutose e manose.

Graças a sua especificidade por açúcares, a lectina de Dioclea grandiflora pode ser obtida de uma maneira relativamente simples, através de cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50. A eluição do material retido pode ser feita, com igual resultado, tanto por abaixamento de pH (usando tampão glicina-HCl pH 3,0) como por eluição com uma solução de glicose 0,1M. A eluição com glicose, no entanto, pode trazer problemas posteriores pois qualquer glicose residual poderá modificar as propriedades biológicas da lectina.

A fração obtida por esse processo (PIII), quando submetida a cromatografia de troca iônica, saiu em apenas um único

pico, não retido quando em DEAE-celulose e retido em coluna de CM-celulose. Estes resultados estão de acordo com os valores dos pIs que estão entre pH 8,6 a pH 9,0 (MOREIRA, et al 1982). Entretanto, os pIs da lectina de Dioclea grandiflora são nitidamente diferentes dos outros membros desse grupo, os quais são fracamente ácidos.

A lectina de Dioclea grandiflora mostrou-se homogênea com um único arco de precipitação por imunodifusão dupla de Ouchterlony e com três subunidades quando submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e beta-mercaptoetanol. Estas três subunidades α , β e γ têm um peso molecular de 8-9000, 13-14000 e 25-26000 respectivamente e são encontradas em todas as formas ativas. Experimentos realizados na ausência de beta-mercaptoetanol mostraram o mesmo resultado indicando que a dissociação da lectina nas três subunidades independe da quebra de pontes S-S, o que é confirmado pela composição de aminoácidos onde se nota uma ausência total de cisteína.

Foi observado que a lectina Dioclea grandiflora apresenta um sistema associante dependente do pH. A valores de pH elevados (9 a 10), a lectina apresenta-se, em Biogel P-100, como um agregado com PM \gg 69.200 e a medida que o pH era abaixado foi observado uma diminuição correspondente no peso molecular aparente da lectina, chegando mesmo a 12000 daltons a pH 2,0. Dependência parecida é encontrada também com a lectina de Canavalia ensiformis (GOLDSTEIN e HAYES, 1978). A mesma dependência foi encontrada para os valores de $S_{20,w}$ quando foram feitos experimentos de velocidade de sedimentação com a lectina de Dioclea grandiflora dissolvida a diferentes valores de pH (MOREIRA et al., 1982). Os valores dos pesos moleculares aparentes, no entanto, apresentaram-se mais baixos que o valor real obtido por experimentos de equilíbrio de sedimentação que foi de 99.480 a pH 8,3 (MOREIRA et al., 1982). Aparentemente há uma interação entre a lectina e o gel com o aumento do volume de eluição e conseqüente diminuição do peso molecular aparente. Interação semelhante não tem sido encontrada na literatura.

A lectina de Phaseolus vulgaris cv. Pinto III, por exemplo, emerge da coluna de Biogel P-100 em um volume de eluição compatível com o seu peso molecular (PUSZTAI et al., 1981).

A atividade da lectina é também influenciada pelo pH. A interação lectina-Sephadex foi testada através de cromatografia de afinidade a diferentes valores de pH. A afinidade entre a lectina e a polidextrana se mostrou claramente dependente do pH, não havendo nenhuma interação a valores de pH abaixo de 4,0. A interação é completa apenas entre pH 6,0 e 9,0 e a pH 10 a afinidade volta a desaparecer. Quando esses resultados são comparados com os dados obtidos por cromatografia em coluna de Biogel P-100 e aqueles obtidos por MOREIRA e colaboradores (1982) por estudos de velocidade de sedimentação nota-se uma dependência estreita entre atividade e forma estrutural, com a lectina apresentando atividade apenas quando sob a forma de 6,0 S.

Com os resultados obtidos, avanços já puderam ser feitos com relação à toxicidade de Dioclea grandiflora e assim é que, MOREIRA e PUSZTAI (1982) mostraram ser a farinha de Dioclea grandiflora Mart., tóxica para ratos, sendo possivelmente a lectina a principal responsável por essa toxidez. Os estudos da influência da lectina de Dioclea grandiflora sobre mastócitos peritoneais de camundongo (OLIVEIRA, et al., 1982), mostraram ser esta capaz de provocar degranulação celular, e que esta reação é dependente de energia metabólica derivada de fosforilações oxidativas.

Avanços também foram feitos, recentemente, em relação a um possível papel dessas lectinas na planta por MOREIRA et al., (1982) que mostraram, por imunodifusão em gel de agar, que a lectina de Dioclea sclerocarpa é reconhecida pelo IgG anti-lectina de Dioclea grandiflora, evidenciando assim um elevado grau de parentesco entre as duas proteínas.

6 - CONCLUSÕES

1. A lectina de Dioclea grandiflora foi melhor extraída entre pH 3,0 e 5,0, com atividade específica mais elevada entre 4,0 e 5,0.
2. A atividade hemaglutinante concentra-se principalmente na fração do Extrato Total precipitada entre 50-70% de saturação de sulfato de amônio.
3. A lectina depende da presença dos cátions Ca^{2+} e Mn^{2+} para a aglutinação completa.
4. A lectina de Dioclea grandiflora foi isolada por cromatografia de afinidade em Sephadex G-50, onde 99,8% da atividade hemaglutinante se concentra na fração retida.
5. Em experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida, a lectina apresentou-se com três subunidades de pesos moleculares de 8-9000, 13-14000 e 25-26000 daltons, as quais são encontradas em todas as frações ativas.
6. A lectina de Dioclea grandiflora apresenta-se como um sistema associante com o aumento do pH.
7. Quando a lectina foi submetida a cromatografia em Biogel P-100, apresentou uma interação com o gel com uma consequente diminuição do peso molecular aparente.
8. A afinidade da lectina por Sephadex é claramente dependente do pH. A valores de pH abaixo de 4,0 não há nenhuma interação lectina-polidextrana. Apenas entre pH 6,0 e 9,0 a interação é completa, a pH 10,0 a interação não é perfei

ta. Há, portanto, uma dependência estreita entre a atividade e a forma estrutural da lectina de Dioclea grandiflora.

9. A lectina de Dioclea grandiflora, não apresenta carboidratos na sua estrutura, não sendo portanto glicoproteína.
10. A lectina de Dioclea grandiflora é caracterizada por uma ausência total de cisteína e baixo teor de metionina.
11. A lectina de Dioclea grandiflora é inibida por resíduos de frutose, manose e glicose, não o sendo por galactose.
12. Por espectro de absorção a lectina de Dioclea grandiflora apresentou um $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ de 12,0 à 280 nm, a pH 7,0.
13. Quanto à sua estrutura quaternária, a lectina de Dioclea grandiflora Mart., em sua forma ativa, é composta por 3 subunidades de pesos moleculares da ordem de 8-9000, 13-14000 e 25-26000 daltons, agrupados em um dímero do tipo $(\alpha, \beta, \gamma)_2$, com peso molecular de 99480 daltons.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, B.B.L. and GOLDSTEIN, I.J. Concanavalin A, the jack bean (Canavalia ensiformis) phytohemagglutinin in Methods in enzymology. Complex carbohydrates vol. XXVIII pags. 313 a 318, Victor Ginsburg, ed., Academic Press, London, 1972.
- BAILEY, J.L. Techniques in protein chemistry. 2nd. Ed., New York revised and expanded edition, Elsevier Publishing Co., 1967.
- BAKER, P.R.W. The microkjeldahl determination of nitrogen. Talanta, 8: 57 - 70, 1961.
- BARONDES, S.H. Lectins: their multiple endogenous cellular functions. Ann. Rev. Biochem. 50: 207 - 231, 1981.
- BENCE, M.L. and SCHMIDT, K. Determination of tyrosine and tryptophan in proteins. Anal. Chem. 29(8): 1193-1196, 1957.
- BESSLER, W. and GOLDSTEIN, I.J. Phytohemagglutinin purification: a general method involving affinity and chromatography. Febs Letters 34(1): 58 - 62, 1973.
- BÉTAIL, G., COULET, M. GENAUD, L. GUILLOT, J. e SCANDARIATO, M. Les stromas erythrocytaires inclus in gel de polyacrylamide. Aplications à la chromatographie d'affinité. C.R. Soc. Biol. 169: 561 - 566, 1975.
- BIDDLE, F. BRONIN, A.P. and SANDERS, F.K. The interaction between weat germ agglutinin and receptors on normal and transformed cells and on erythrocytes. Cytibios, 5 : 9 - 17, 1970.

- BITTIGER, H. and SCHNEBLI, H.P. Concanavalin A as a tool. John Wiley & Sons, London, 1976.
- BOHLOOL, B.B. and SCHMIDT, E.L. Lectins: A possible basis for specificity in the Rhizobium legume root nodule symbiosis. Science 185 (4147): 269 - 271, 1974.
- BOYD, W.C. The lectins: Their present status. Vox sang 8: 1 - 32, 1963.
- BOYD, W.C. and SHARPLEIGH, E. Science 119: 419, 1954. citado em LINENER, I.E., 1976(a).
- CAVADA, B.S. Lectinas de Canavalia brasiliensis Mart. Isolamento, caracterização parcial e comportamento durante a germinação. Tese de mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 87pp., 1980.
- CHIN, J.C. and SCOTT, K.J. Effect of phytolectins on isolated protoplasts from plants. Ann. Bot. 43: 33 - 34, 1979.
- CLAUSEN, J. Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules, in T.S. Work and E. Work Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. North-Holland Publishing Company-Amsterdam-London, 1969.
- DETERMAN, H. Gel chromatography. Springer-Verlag. 2nd., New York 202 pp., 1969.
- DOWNING, H.J., KEMP, G.C.M. and DENBOROUGH, M. A. Plant agglutinins and mitosis. Nature 217(17): 654-655, 1968.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A. HAMILTON, J.K. REBERS, P. A. and SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28(3): 350 - 356, 1956.

- ENNIS, M., TRUNEH, A. and PEARCE, F.L. Lectin-induced histamine secretion from isolated rat and guinea pig mast cells. Biochemical Pharmacology, 30(15): 2179 - 2181, 1981.
- ENTLICHER, I., KOSTJR, V. and KOCOUREK, J. Studies on phytohemagglutinins, III. Isolation and characterization of hemagglutinins from the pea Pisum sativum L. Biochim. Biophys. Acta, 221: 272 - 281, 1970.
- FORIERS, A., DENEVE, R., KANAREK, L. e STROSBERG, A. D. Common ancestor for concanavalin A and lentil lectin? Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 1136 - 1139, 1978.
- GALBRAITH, W. and GOLDSTEIN, I.J. Lima bean (Phaseolus lunatus) lectin in Methods in Enzymology. Complex carbohydrate, vol XXVIII, pags 318 - 323, Victor Ginsburg, ed., Academic Press, London, 1972.
- GASPERI-CAMPANI, A., BARBIERI, L., LORENZONI, E. and STIRP, F. Inhibition of protein synthesis by seed-extracts. Febs Letters, 76(2): 173 - 176, 1977.
- GOLD, E. and BALDING, P. Receptor specific proteins: plant and animal lectin. Excerpta Medica, Amsterdam, 1975.
- GOLDBERG, A.R. & BURGER, M.M. Identification of a tumor specific determinant on neoplastic cells surfaces. Proc. Natl. Acad. 57: 359 - 366, 1967, citado em MANEN, 1975.
- GOLDSTEIN, I., HUGHES, R.C., MONSIGNY, M., OSAWA, T. and SHARON, N. What should be called a lectin? Nature, 285(5760) : 66, 1980.
- GOLDSTEIN, I.J. and HAYES, C.E. The lectins: Carbohydrate-binding proteins of plants and animals, in R.S. Tipson and Horton, Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry,

vol. 35, Academic Press, New York, 1978.

- HAMBLIN, J. e KENT, S.P. Possible role of phytohemagglutinin in Phaseolus vulgaris L. Nature, 245(149): 28-30, 1973.
- HANKINS, C.N., KINDINGER, J.I. and SHANNON, L.M. Legume Lectins I. Immunological cross-reactions between the enzymic lectin mung beans and other well characterized legume lectins. Plant Physiol., 64: 104-107, 1979.
- HARBOE, N. and INGLID, A. Immunization, isolation of immunoglobulins, estimation of antibody titre, in A manual quantitative immunoelectrophoresis. Ed. N.H. Axelsen et al, Blackwell Scientific Publications, London, 1973.
- HILLER, A., PLAZIN, J. and SLYKE, D.V. A study of conditions for Kjeldahl determination of nitrogen in proteins. J. Biol. Chem., 176: 1401 - 1420, 1948.
- HOREJSI, V. and KOCOUREK, J. Studies an phytohemagglutinin . XXI The covalent oligomers of lysozyme. First case of semisynthetic hemagglutinins. Experientia, 30: 1348 - 1349 , 1974.
- HOWARD, J., SHANNON, L. OKI, L. and MURASHIGE, T. Soybean agglutinin. A mitogen for soybean callus cells. Exp. Cell Res. 107: 448 - 450, 1977.
- HOWARD, J., KINDINGER, J. and SHANNON, L.N. Conservation of antigenic determinants among different seed lectins. Arch. of Biochem. Biophys., 192(2): 457 - 465, 1979.
- JAFFÉ, W.C. Toxicity of raw kidney beans. Experientia 5: 81 , 1949, citado em JAFFÉ, 1969.
- JAFFÉ, W.C. Hemagglutinins, in Toxic constituents of plant

- foodstuffs, Liener, I.E., ed., Academic Press, New York, 1969.
- JAFFÉ, W.G., LEVY, A. and GONZÁLEZ, D.I. Isolation and partial characterization of bean phytohemagglutinin. Phytochemistry, 13: 2685 - 2693, 1974.
- JAFFÉ, W.G. and GOMEZ, M.J. Beans of high or low toxicity. Qual. Plant. Pl. Fds. hum. Nutr. XXIV, 3/4: 359 - 365, 1975.
- KAUS, H. Physiology. I. Plant lectins (Phytohemagglutinins) . Progress in Botany, 38: 58 - 70, 1977.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. Nature, 227:680-685, 1970.
- LARKIN, P.J. Plant protoplast agglutination by lectins. Plant. Physiol. 61: 626 - 629, 1978.
- LIENER, I.E. Soyin. a toxic from the soybean. J. Nutrition . 49(3): 527 - 539, 1953.
- LIENER, I.E. Toxic factors in edible legumes and their elimination. American Journal of Clinical Nutrition. 11:281-298, 1962.
- LIENER, I.E. Seed hemagglutinins Econ. Botany. 18(1): 27 - 33, 1964.
- LIENER, I.E. Antitryptic and other antinutritional factors in legumes. Offprints from nutritional improvement of foods legumes by breeding. Edited by Max Milner - Published by John Wiley (1967) and sons., 1975.
- LIENER, I.E. Phytohemagglutinins (Phytolectins). Ann. Rev. Plant. Physiol., 27: 291 - 319, 1976(a).

- LIENER, I.E. Legume toxins in relation to protein digestibility. A review. Journal of Food Sc., 41: 1076 - 1080, 1976(b).
- LIS, H. and SHARON, N. The biochemistry of plant lectins (Phytohemagglutinins). Ann. Rev. Biochem. 42 541 - 574, 1973.
- LIS, H., LOTAN, R. and SHARON, N. Synthesis and use of affinity chromatography columns for the purification of plant lectins. Annual N. Y. Acad. Science, 234: 232-238, 1974.
- LIS, H. and SHARON, N. Lectins in higher plants in The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. Vol.6 Abraham Mercus, ed, Academic Press. London, 1981.
- LUTSYK, M.D., LUTSYK, A.D., KIPIANI, E.K. KRUPKD, A. E. The toxicity and antitumor activity of three individual fractions of lectins from Ricinus comunis seeds. Neoplasma 24 (3): 341 - 343, 1977.
- MAKELA, O. Studies hemagglutinins of leguminosae seeds. II. Occurrence of agglutinins in plants. Ann. Med. Biol. FENNIAE, 35: 32 - 133, 1957.
- MANEN, J.F., in MIÉGE, J. Les protéines des graines, Georg Editeur, Genève, 1975.
- MOORE, S., SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins - An Improved system. Anal. Chemistry, 30(7): 1185 - 1190, 1958.
- MOORE, S. On the determination of cystine as cysteic acid. J. Biol. Chem. 238(1): 235 - 237, 1963.
- MOREIRA, R.A. 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., 1975.
- MOREIRA, R.A., PUSZTAI, A.J. e BARROS, A.C.H. Lectina de Dioclea sclerocarpa Ducke. Isolamento e caracterização parcial. Arg. Biol. Tecnol. 25(1): 118, 1982.
- MOREIRA, R.A. e PUSZTAI, A. (1982) - Comunicação pessoal.
- MUELENAERE, H. J. H. Toxicity and hemagglutinating activity of legumes. Nature, 206: 827 - 828, 1965.
- NOWELL, P.C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in culture of human leucocytes. Cancer Res., 20: 462, 1960. Citado em LIS e SHARON, 1981.
- OCHOA, J.L. and KRISTIANSEN, T. Stroma: as an affinity adsorbent for non-inhibitable lectins. Febs Letters, 50(1): 145-148, 1978.
- OLIVEIRA, J.T.A. 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, 1980.
- OLIVEIRA, M.C., SILVA LIMA, A., PROUVOST DANON, MOREIRA, R. A. e FREDERICO, M.V.F. Participação da energia metabólica na degranulação de mastócitos peritoneais de camundongos induzida por lectina de Dioclea grandiflora Mart. Ciência e Cultura, 34: 623, 1982.
- OLSNES, S., REFSNES, K. and PIHL, A. Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. Rep. Nature, 249 (5458): 627 - 631, 1974.
- OLSNES, S., SALTVEDT, E. and PIHL, A. Isolation and comparison

- of galactose-binding lectins from Abrus precatorius and Ricinus communis. J. Biol. Chem. 249(3): 803 - 810, 1974.
- OLSNES, S., HAYLETT, T. and REFSNES, K. Purification and characterization of the highly toxic lectin modeccin. J. Biol. Chem., 253(14): 5069 - 5073, 1978.
- OLSNES, S. and PIHL, A. Abrin and ricin. two toxic lectins. TIBS, 7 - 10, 1978.
- ORAM, J.D. ELLWOOD, D.C. APPLEYARD, G., STANLEY, J.L., Nature New Biol. 233, 50, 1971. Citado em SHARON e LIS, 1972.
- PALMER, R. McINTOCH, A. PUSZTAI, A. J. Sci. Ed. 937-944, 1973. Citado em PUSZTAI, 1981.
- PER VRETBLAD - Purification of lectins by biospecific affinity chromatography. Biochem. Biophys. Acta. 434:169-176, 1976.
- PETERSON, E.A. e SOBER, H.S. Column chromatography of proteins: substituted celluloses, in COLLOWICK, S.P. ed., Methods in Enzimology. Academic Press, New York, 1962.
- PUEPPKE, S.G., KEEGSTRA, K., FERGUSON, A.L. and BAUER, W. D. Role of lectins in plant - microorganism interactions II. Distribution of soybean lectin in tissues of Glycine max (L.). Merr. Plant Physiol. 61: 779 - 784, 1978.
- PUSZTAI, A. Planta, 107, 121 - 129, 1972. Citado em PUSZTAI 1981.
- PUSZTAI, A. CLARKE, E.M.W. and KING, T.P. The nutritional toxicity of Phaseolus vulgaris Lectins. Proc. Nutr. Soc. 38: 115 - 121, 1979.
- PUSZTAI, A. Nutritional toxicity of the Kidney bean (Phaseolus

- vulgaris). Rep. Rowett Inst. 36: 110 - 118, 1981.
- PUSZTAI, A., CLARKE, E.M.W., GRANT, G. and KING, T.P. The toxicity of Phaseolus vulgaris Lectins. Nitrogen balance and immunochemical studies. J. Sci. Food Agric. 32: 001 - 010, 1981.
- PUSZTAI, A., GRANT, G., e STEWART, J.C. A new type of Phaseolus vulgaris (cv. PINTO III) seed lectins: isolation and characterization. Biochim. Biophys. Acta, 671:146-154,1981.
- SCHOUSBOE, I. Purification, characterization and identification of an agglutinin in human serum. Biochem. Biophys. Acta, 579: 396 - 408, 1979.
- SELA, B.A., LIS, H., SHARON, N. and SACHS, L. Different locations of carbohydrate-containing sites in the surface membrane of normal and transformed mammalian cells. J. Membrane Biol. 3: 267 - 279. Springer - Verlag New York Inc., 1970.
- SHARON, N. and LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar specific proteins. Science, 177(4053): 949 - 959, 1972.
- SHARON, N., LIS, H. and LOTAN, R. On the structural diversity of lectins, in Methodologie de la structure et du metabolisme des glicoconjugués. Colloques Internationaux du CNRS, 221(1): 20 - 27, 1973, Edition du CNRS, 1974.
- SILVA LIMA, M., PROUVOST-DANON, A., MOREIRA, R.A., BENEVIDES, R.H. e BRITO, F.P. Degranulation of mast cells by lectin from mucunã (Dioclea grandiflora Mart.). III Pan American Biochemistry Congress, México (México), 1981.
- SILVA LIMA, M., PUSZTAI, A., PROUVOST-DANON, A., BENEVIDES, R. H.P. e OLIVEIRA, M.C. Allergenicity and degranulation of mast cells by lectin from Kidney bean (Phaseolus vulgaris)

cv. Processor). International Symposium on Seed Proteins ,
Versailles (França), 1981.

TICHÁ, M., ENTLICHER, J., KOSTIR, V. and KOCOUREKE, J. Studies
on phytohemagglutinin from the lentil, Lens sculenta Moench.
Biochim. Biophys. Acta, 221: 282 - 289, 1970.

TRIEBOLD, H.O. Quantitative analysis with applications to
agricultural and food products. New York, D. Van Nostrand
Co., 1946.

VASIL, I.K. and HUBBELL, D.H. The role of lectins in cell
division of tissue cultures of soybean and tabacco. Z.
Pflanzenphysiol. Ed. 84: 349 - 353, 1977.

8 - COMUNICAÇÕES A CONGRESSOS

LECTINA DE Dioclea grandiflora Mart. ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL.

R.A. Moreira*, A.J. Pusztai** e A.C.H. Barros*.

*Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, Univ. Fed. Ceará. Fortaleza - Ceará.

**Dept. Protein Biochemistry. The Rowett Research Institute. Aberdeen - Escócia.

A lectina de mucunã de caroço (*Dioclea grandiflora* Mart.) isolada por extração a pH 5,0 (tampão acetato 0,1 M) e precipitação com sulfato de amônio (entre 50 e 70% de saturação), foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50.

A lectina, quando tratada com beta-mercaptoetanol e submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, apresentou 3 subunidades com pesos moleculares da ordem de 8.000, 16.000 e 32.000 daltons. A lectina se mostrou como um sistema associante, pH-dependente, apresentando pesos moleculares variando da ordem de 12.000 (pH 2,0) a 60.000 daltons (pH 10,0).

Quando submetida a eletrofocalização em placa de poliacrilamida, a lectina apresentou microheterogeneidade com 5 bandas de pI entre 8,6 e 9,0 mas apenas um único arco de precipitação por imunodifusão em gel de agar (comportamento característico de um sistema de isolectinas).

Foi notada a ausência de carboidratos e a composição de amino ácidos se caracterizou pela quase ausência de cistina e baixo teor de metionina.

Auxílios financeiros: FINEP, CNPq e British Council.

LECTINA DE Dioclea grandiflora Mart. DETERMINAÇÃO DE ALGUMAS PROPRIEDADES FÍSICOQUÍMICAS

A.C.H. Barros^{*}, J.C. Stewart^{**}, A.J. Pusztai^{**}, R.A. Moreira.

^{*} Dept^o de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, UFC. C.P. 1065, Fortaleza, CE.

^{**}The Rowett Research Institute, Aberdeen, Escócia.

A lectina de Dioclea grandiflora Mart. (mucunã de caroço) isolada por extração a pH 5.0 precipitação com sulfato de amônio (50 - 70% de saturação) e purificada por cromatografia em coluna de Sephadex G-50, apresenta um sistema associante pH dependente, quando submetida a cromatografia em coluna de Biogel P₁₀₀ (R.A. Moreira et al, Arq. Brasil. Tecnol. 25 (1): 118, 1982).

Com o objetivo de melhor esclarecer esta dependência e investigar a possível relação entre o estado de associação e a atividade foram feitos experimentos de equilíbrio de sedimentação, a valores de pH variando de 2,43 a 9,92, e cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50, valores de pH de 3,0 a 10,0.

Os valores de $S_{20,w}$ encontrados iam de 3,1 até > 10, notando-se no entanto uma predominância de componentes com $S_{20,w} = 6,0 - 6,3$, cujo aparecimento coincide com o surgimento da afinidade pela coluna de Sephadex G-50, sugerindo uma dependência da atividade com relação à estrutura.

Auxílio financeiro: FINEP, CNPq, British Council.

II REUNIÃO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA

RECIFE 27 a 29 de Outubro de 1982