UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

Purificação e Propriedades de Hemaglutininas de uma Variedade Brasileira de Feijão *Phaseolus vulgaris, L.*

Roberto Gonçalves Junqueira
Farmacêutico-Bioquímico

Orientador:
Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

À minha esposa, Rosa.

AGRADECIMENTOS

O autor deseja externar os seus mais sinceros agradecimentos a todos que direta e indiretamente contribuiram para a realização deste trabalho, e especialmente:

ao Professor Valdemiro Carlos Sgarbieri, por sua orientação dedicada e amiga;

à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da UNICAMP, pela oportunidade ;

à CAPES/PICD, pela bolsa concedida na etapa inicial deste trabalho;

ao Professor Frederick Carl Strong III, pelo incentivo e confiança;

ao Professor Jaime Amaya-Farfán pelas oportunas sugestões;

à Professora Maria Antonia Martins Galeazzi, pelo apoio amigo e colaboração na etapa experimental;

aos Professores Lúcia Emy dos Santos e Geraldo Hélio Coelho, do Departamento de Química Aplicada da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFMG, pelo estímulo;

aos colegas Ilana, Lúcia, Carlos, Tânia, Eliana e Júlia pelo apoio em todos os momentos;

aos meus amigos Alfeu, Eduardo, Fernando e Rafael pela convivência e incentivo;

aos meus pais Odilon e Henedina e aos meus irmãos, pelo carinho e confiança;

à Tânia e Adelaide pelo auxílio no laboratório, à Li pelos desenhos, à Niura e Julio pelo trabalho datilográfico.

ÍNDICE

RESUMO 1

SUMMARY 3

INTRODUÇÃO 5

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 8

- Ocorrência 8
- Propriedades Biológicas 9
- Metodologia de Detecção 12
- Isolamento e Caracterização 15

MATERIAL E MÉTODOS 22

- Amostras 22
- Reagentes 22
- Instrumental 22
- Determinação de Proteína 23
- Determinação da Atividade Hemaglutinante 23
- Extração e Fracionamento das Proteínas do Feijão Rosinha G2 24
- Separação por Cromatografia em Gel 26
- Purificação das Hemaglutininas 26
- Eletroforese de Disco em Gel de Poliacrilamida 27
- Focalização Isoelétrica em Gel de Poliacrilamida 27
- Sedimentação em Gradiente Linear de Densidade 28
- Determinação de Parâmetros Moleculares por Cromatografia em Gel 29
- Determinação da Absortividade Específica 32
- Determinação de Carboidratos 33
- Determinação de Aminoácidos 33

RESULTADOS 34

Extração e Fracionamento 34
Separação por Cromatografia em Gel 36
Purificação das Hemaglutininas 42
Estudo Eletroforético 46
Focalização Isoelétrica em Gel de Poliacrilamida 52
Sedimentação em Gradiente Linear de Densidade 52
Determinação de Parâmetros Moleculares por Cromatografia em Gel 56
Análise do Espectro de Absorção 59
Determinação de Carboidratos 59
Determinação de Aminoácidos 59

DISCUSSÃO 62

CONCLUSÕES 71

BIBLIOGRAFIA 73

QUADROS

I - Algumas propriedades de hemaglutininas isoladas de *Phaseolus vulgaris*. 21

II - Extração, fracionamento e recuperação das proteínas e da atividade hemaglutinante das sementes do feijão Rosinha G2 35

III - Purificação das hemaglutininas do feijão Rosinha G2 (*Phaseolus vulgaris*). 45

IV - Cromatografia em Sephadex G-200 de proteínas de raio molecular conhecido. 56

V - Propriedades físico-químicas da hemaglutinina do feijão Rosinha G2 (*Phaseolus vulgaris*). 58

VI - Composição em aminoácidos e carboidratos da hemaglutinina do feijão Rosinha G2. 67

FIGURAS

1 - Esquema de extração e fracionamento das proteínas do feijão Rosinha G2 (*Phaseolus vulgaris*). 25

2 - Cromatografia em Sephadex G-200 de proteínas de peso molecular conhecido. 37

3 - Separação por cromatografia em gel, extrato salino bruto. 39

4 - Separação por cromatografia em gel, fração GLB. 40

5 - Separação por cromatografia em gel, fração ALB. 41

6 - Separação por cromatografia de afinidade. 43

7 - Separação por cromatografia em gel, componente CII-Af. 44

8 - Eletroforese de disco, EXT, ALB, GLB. 47

9 - Eletroforese de disco, HA-EXT, HA-GLB, HA-ALB. 48

10 - Eletroforese de disco, Componente CII-Af. 49

11 - Eletroforese de disco, Componente CII-β 50

12 - Eletroforese de disco: diagrama de interpretação. 51

13 - Eletrofocalização em gel. 53

14 - Focalização isoelétrica: curva pH x comprimento do gel. 54

15 - Sedimentação em gradiente linear de densidade. 55

16 - Espectro de absorção da hemaglutinina purificada. 60

RESUMO

Foi realizado um estudo inicial de extração, fracionamento e recuperação das proteínas e da atividade hemaglutinante de sementes de feijão Rosinha G2 (*Phaseolus vulgaris*). O extrato bruto foi obtido em NaCl 0,5M, e as proteínas foram fracionadas por diferença de solubilidade em meios de baixa força iônica, após diálise por 36 horas contra água destilada. A atividade mostrou maior tendência em concentrar-se na fração solúvel (ALB), contudo, uma atividade específica hemaglutinante quatro vezes menor foi detectada na fração insolúvel (GLB). Eletroforeticamente, estas frações não se mostraram completamente distintas e quando foram fracionadas pelo tamanho molecular de seus constituintes, por cromatografia em Sephadex G-200, a atividade hemaglutinante apresentou-se, aproximadamente, em uma mesma faixa de peso molecular.

A hemaglutinina do feijão Rosinha G2 foi purificada por uma sequência de etapas envolvendo cromatografia de afinidade em ConA-Sepharose e cromatografia em gel de Sephadex G-200. A análise eletroforética, em géis de poliacrilamida, a pH 8,4, da preparação obtida na primeira etapa da purificação, componente CII-Af, indicou que a atividade hemaglutinante é devida à presença de, pelo menos, três grupos de glicoproteínas. A preparação obtida na última etapa de purificação, componente CII-β, apresentou-se como uma banda larga e densa, sendo o perfil interpretado como um fenômeno de agregação entre os constituintes da preparação hemaglutinante final. Quando este material foi analisado por eletrofocalização em gel de poliacrilamida revelou que a atividade hemaglutinante é devida ao componente de ponto isoelétrico na faixa de pH de 5,5 - 5,7, sendo contaminado, principalmente, por um componente de ponto isoelétrico em pH = 4,7, que não apresentou atividade hemaglutinante.

Foi observado que os eritrócitos bovinos, tripsinizados, quando tratados com soluções de hemaglutinina, mostravam afinidade por superfícies de acetato de celulose. Esta afinidade foi interpretada como interações inespecíficas, devidas a forças de natureza polar, que foram também responsabilizadas pela agregação observada no componente CII-β. A hemaglutinina purificada, CII-β, teve sua composição de aminoácidos determinada, revelando-se deficiente em aminoácidos sulfurados (traços) mas rica em ácido aspártico (11,64%) e serina (7,66%). Revelou-se uma glicoproteína, contendo 8,30% de açúcares neutros e 2,21% de glicosamina.

Por cromatografia em gel, a hemaglutinina apresentou um raio molecular de Stokes de 43Å e um peso molecular de 136.000. O raio molecular foi utilizado para o cálculo de sua constante de difusão, 5,0 $cm^2.s^{-1}$. Por ultracentrifugação em gradiente de densidade, foi determinado seu coeficiente de sedimentação, 6,9S e calculou-se seu volume específico parcial, 0,75 $m\ell.g^{-1}$, pela equação de Svedberg, para uma diluição infinita. Estes dados foram utilizados para estimar-se o comportamento hidrodinâmico da hemaglutinina, pela determinação de seu quociente friccional, f/f_o = 1,3. Este valor indica que a proteína pode assumir combinações de hidratação e assimetria dentro dos seguintes limites: 0,9g de água por grama de proteína e a/b = 6, se o modelo de um elipsóide prolato for escolhido.

As propriedades químicas e físico-químicas, determinadas para a hemaglutinina do feijão Rosinha G2, mostraram que é semelhante em muitos aspectos fundamentais a outras hemaglutininas purificadas, de diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris*.

The present is a preliminary study on some physicochemical properties of the bean (*Phaseolus vulgaris*, variety "Rosinha G2") proteins such as solubility, electrophoretic mobility, molecular weight distributions and hemagglutinating activity. The crude extract was prepared by extracting the flour with a 0.5M NaCl solution. The proteins were fractionated using their differences in solubility as the ionic strength was lowered by means of dialysis against distilled water for 36 hours. Most of the hemagglutinating activity was found in the soluble fraction (albumins). Some activity was detected in the insoluble fraction (globulins), which was four times lower than that found in the albumins. However, it was shown electrophoretically that the hemagglutinating components were similar in both fractions. When the protein constituents were separated on the bases of their molecular size, the hemagglutinating activity was found approximately on the same range of molecular weights.

The hemagglutinin prepared from this bean was obtained by a sequence of steps involving affinity chromatography on ConA-Sepharose and gel chromatography on Sephadex G-200. The agglutinating preparation obtained by affinity chromatography, component CII-Af, was shown by polyacrylamied-gel electrophoresis to be composed of, at least, three groups of active glycoproteins. Under the same conditions, the preparation obtained at the last step of purification component CII-β, gave a broad band, which was interpreted to be the result of aggregation. The gel-electrofocusing pattern of this material showed that the hemagglutinating activity was associated with the component separated in the pH range of 5.5-5.7. Other in

active components were also present, particularly at pH4.7.

It was noted during the hemagglutinating activity tests that the erythrocytes after treatment with hemagglutinin solutions adhered to the cellulose acetate surfaces. This affinity was probably due to nonspecific interactions occuring between groups of polar nature, which could be responsible for the aggregation of the constituents of CII-β.

The purified hemagglutinin was characterized as a glycoprotein, containing 8.30% of neutral sugars (as mannose) and 2.12% of hexosamine (as glucosamine). It was shown to be deficient in sulfur - containing amino acids (traces) but rich in aspartic acid (11.64%) and serine (7.66%).

The hemagglutinin revealed a Stokes radius of 43Å and a molecular weight of 136,000, as obtained by gel chromatography. The molecular radius was used to calculate the approximate value of the diffusion constant, $D_{20,w} = 5.0 \times 10^{-7} cm^2.s^{-1}$. The sedimentation coeficient which was determined in a linear sucrose density was 6.9S. These parameters were substituted in the Svedberg equation to determine its partial specific volume, $\bar{v} = 0.75\ m\ell.g^{-1}$.

The hydrodynamic behavior of the hemagglutinin was estimated by the calculation of its frictional ratio, $f/f_o = 1.3$. This value indicated that the protein had a maximum hydration of 0.9 g of water per gram of protein and a maximum axial ratio, $a/b = 6$ if a prolate ellipsoid of revolution was chosen as the model.

The chemical and physicochemical properties of the hemagglutinin prepared from the bean "Rosinha G2" were similar in many fundamental aspects to other hemagglutinins obtained from the seeds of different varieties of *Phaseolus vulgaris*.

INTRODUÇÃO

As hemaglutininas, ou lectinas, são substâncias que contêm sítios específicos de combinação com carboidratos. Sua interação com os eritrócitos é atribuída à combinação com glicopeptídeos receptores, presentes nas paredes celulares, que resulta, macroscopicamente, na aglutinação das células. Foram identificadas nos fins do século XIX, e desde então, têm auxiliado o homem no esclarecimento de muitos fenômenos da natureza.

A descoberta das primeiras toxinas vegetais, por Stillmark, em 1888, levou Erlich a imunizar ratos com pequenas injeções subcutâneas de hemaglutininas, o que se constituiu na base experimental para que, mais tarde, propusesse a teoria da formação de anticorpos, um dos mais fundamentais conceitos da Imunologia.

A presença destas toxinas em sementes comestíveis é conhecida desde 1908, quando foram identificadas em *Phaseolus vulgaris* e outras leguminosas. Contudo, o seu verdadeiro papel na determinação do valor nutritivo de sementes é ainda controvertido. Atribui-se o efeito tóxico a suas interações com a mucosa intestinal, que resultam em uma interferência inespecífica na assimilação de nutrientes.

As lectinas não despertam interesse apenas por seu efeito tóxico. A especificidade de certas hemaglutininas para diferentes eritrócitos humanos, tem possibilitado sua utilização na detecção de grupos sanguíneos em estudos antropológicos e clínicos. Foi fundamental o seu papel no esclarecimento das bases estruturais da classificação sanguínea e, também, se constituem em excelentes modelos nos estudos da reação de antígeno-anticorpo.

A sua utilização na separação de leucócitos, pela aglutinação das hemácias, levou Nowel, em 1960, a descobrir que estas glicoproteí-

nas podiam induzir linfócitos humanos a sofrerem divisão mitótica, *in vitro*. Esta observação foi de inegável contribuição, pois tem auxiliado a melhor compreensão de anormalidades cromossômicas envolvidas em doenças humanas.

Já se demonstrou que certas lectinas aglutinam, *in vitro*, células de tumores e, *in vivo*, já foi possível inibir-se tumores, induzidos em animais de laboratório. Estas propriedades são de enorme interesse, particularmente, para aqueles cientistas envolvidos no estudo do câncer.

Pesquisas recentes parecem indicar que as hemaglutininas são determinantes na seleção de linhagens infectivas de bactérias fixadoras de nitrogênio, que vivem em simbiose com leguminosas. Estas observações não se constituem apenas em valiosa contribuição para a pesquisa agronômica, mas são também de natural importância taxinômica.

Diversas hipóteses já foram propostas para explicar a função das hemaglutininas na natureza. Para muitas ainda não existem comprovações experimentais, e talvez não seja tão aparente a relação de suas propriedades químicas e biológicas, observadas *in vitro*, com seu verdadeiro papel nos animais e vegetais. Procurando uma melhor compreensão dos fenômenos envolvidos em suas diferentes atividades, tem-se procurado conhecer mais detalhadamente as estruturas e propriedades destas glicoproteínas.

As hemaglutininas purificadas de diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris* parecem ter características químicas e físico-químicas semelhantes. Acredita-se que são formadas de combinações de duas subunidades diferentes, em cinco proteínas tetraméricas possíveis. Uma destas subunidades seria responsável pela atividade eritroaglutinante e a outra pela atividade mitótica em linfócitos. Assim, a combinação de ambas, em uma única forma protomérica, permitiria a existência das duas atividades em uma única estrutura.

Contudo, já se demonstrou que várias lectinas de *P. vulgaris* diferem em seu conteúdo de carboidratos, em suas constantes físico-químicas e mesmo em suas propriedades biológicas. Valores na faixa de 90.000 - 150.000 são normalmente atribuídos aos pesos moleculares destas hemaglutininas. Já foi comprovada a existência de varieda-

des não mitogênicas e demonstrou-se que mais de cinco formas protoméricas podem estar presentes, mesmo nestas variedades. Ainda que esta variabilidade possa ser atribuída a fatores genéticos, os diferentes métodos de isolamento e critérios de pureza devem contribuir para as diferenças encontradas em suas propriedades moleculares.

Os principais objetivos deste trabalho foram purificar uma ou mais formas hemaglutinantes de uma variedade brasileira de feijão e estudar suas propriedades químicas e físico-químicas.

Ocorrência

O estudo das hemaglutininas, ou lectinas, iniciou-se em 1888, quando Stillmark identificou, em sementes de mamona (*Ricinus comunis*), uma fração protéica capaz de aglutinar as células vermelhas do sangue do homem e de animais. Esta fração, denominada Ricina, mostrou-se extremamente tóxica, levando outros pesquisadores da época a identificarem o fenômeno da hemaglutinação em inúmeros vegetais. A presença das então denominadas fito-hemaglutininas em sementes de plantas utilizadas para fins alimentícios, como por exemplo *Phaseolus vulgaris* e outras leguminosas, foi constatada por Landsteiner & Raubitschek, em 1908, embora nenhum efeito tóxico tivesse sido observado naquela época.

Revisões cobrindo o período de 1888-1969 (*3,14,41*) citam que as sementes de plantas das famílias *Leguminoseae* e *Euphorbiaceae* são as principais fontes de hemaglutininas na natureza. Podem, contudo, ocorrer em outros órgãos de vegetais, como em tubérculo de batata (*Solanum tuberosum*) (*117*), germe de trigo (*Triticum vulgaris*) (*8*), folhas e raízes de luguminosas (*12,14*).

Em *Phaseolus vulgaris*, segundo Saint-Paul (*97*), são encontradas como material de reserva nas sementes, mas podem ocorrer transitoriamente nas folhas de plantas jovens. Susplugas & Coulet (*108*) acreditam que as hemaglutininas são sintetizadas nas folhas sem se acumularem aí, sendo transportadas e estocadas nos cotilédones. Como afirmam Pusztai & Stewart (*86*), as hemaglutininas podem ser encontradas associadas à membranas de organelas intracelulares, como mitocôndrias e corpos protéicos.

Nos animais, foram identificadas em glândulas de alguns moluscos e hemolinfa de invertebrados (*51*); em ovas de peixes teleósteos e até em tecidos hepáticos de aves e mamíferos (*79*).

Propriedades Biológicas

A especificidade de certas hemaglutininas, em suas reações com eritrócitos de indivíduos de uma mesma espécie, foi descoberta independentemente por Renkonem, em 1948 (*91*) e Boyd & Reguera, em 1949 (*15*). O termo "lectina" (do latim, *legere* = eleger, escolher), proposto por Boyd & Shapleigh (*17*), refere-se a esta propriedade; entretanto, adquiriu uma aplicação mais genérica sendo utilizado em substituição a "fito-hemaglutinina". No presente trabalho os termos "hemaglutininas" e "lectinas" foram empregados indistintamente.

Na literatura existe uma tendência em se distinguir hemaglutininas "específicas" e "não-específicas". São ditas específicas aquelas que aglutinam seletivamente eritrócitos de um determinado grupo sanguíneo humano, ou, formam precipitados com antígenos solúveis do grupo correspondente (*16*). As hemaglutininas não específicas aglutinam eritrócitos de todos os grupos sanguíneos e se constituem na maioria das hemaglutininas conhecidas. Esta distinção, todavia, deve merecer certa crítica, pois obscurece o fato das hemaglutininas ditas "não-específicas" mostrarem diferenças marcantes em sua afinidade por eritrócitos de diferentes espécies, como observaram Landsteiner & Raubitschek em 1908 (*57*).

Morgan & Watkins, em 1953 (*72*) investigando as bases químicas da classificação sanguínea observaram que a atividade hemaglutinante de lectinas "específicas" podia ser inibida por determinados monossacarídeos. Assim, lectinas anti-H perdiam sua atividade em presença de α-L-fucose enquanto lectinas anti-A eram inibidas por α-D-N-acetilgalactosamina. A lectina ante(A+B) de *Caupurnia aurea*, em presença de D-galactose, torna-se específica para células do tipo A, indicando a inibição do sítio B-específico.

As hemaglutininas de *Phaseolus vulgaris* são "não-específicas" e não podem ser inibidas por um único açúcar na faixa de concentração normalmente empregada para inibir outras lectinas (*13*). Korn-

feld & Kornfeld (*54*), isolaram de membranas de eritrócitos humanos um glicopeptídeo fortemente inibidor da lectina de "Kidney bean" (*P. vulgaris*). Demonstrou-se que o resíduo terminal de β-D-galactopiranose era o principal responsável pelo efeito inibitório e que outros açúcares internos, particularmente resíduos de D-manopiranose, estão envolvidos na interação do glicopeptídeo com o sítio ligante da hemaglutinina. A remoção de ácido siálico presente neste glicopeptídeo não afetou o seu efeito inibitório. Glicopeptídeos obtidos de fetuína, transferina e tiroglobulina causam também considerável efeito inibitório sobre esta lectina (*58,69,98*).

Jaffé *et al.* (*43*) classificam as hemaglutininas de *P. vulgaris* em quatro grupos de acordo com sua afinidade para eritrócitos de diferentes animais. Em estudo envolvendo diferentes variedades e cultivares, Jaffé e Brücher (*42*) observaram que, apenas os extratos que aglutinavam eritrócitos de bovino, tratados com tripsina, eram tóxicos quando injetados intraperitonealmente em ratos.

Além dos eritrócitos, as hemaglutininas podem interagir com outras células do organismo. Nowell, em 1960 (*77*), demonstrou que a hemaglutinina de "Red Kidney Bean" (*P. vulgaris*) podia transformar *in vitro* linfócitos do sangue periférico humano em grandes células morfologicamente primitivas. Este efeito, denominado "blastogênese" é acompanhado de um aumento na síntese de proteínas e ácidos nucléicos, tornando as células aptas a sofrerem divisão mitótica (*37*). Também de especial interesse foram as observações de Nordman *et al.* (*75*), que esta hemaglutinina, quando em elevadas concentrações, podia provocar a aglutinação de leucócitos, formando aglutinados mistos. Em concentrações mais baixas, os eritrócitos e leucócitos formavam aglutinados separados e em concentrações ainda mais baixas ocorria apenas aglutinação de eritrócitos.

Em 1963, Aub *et al.* (*8*) observaram que a hemaglutinina do germe do trigo aglutinava células de tumores de ratos, quando não se observava nenhum efeito sobre as células normais do mesmo tecido. Contudo, se as células normais sofressem tratamentos breves com enzimas proteolíticas, tal como a tripsina, a aglutinação era observada. Burger & Goldberg (*20*) sugeriram que ambos os processos, formação de tumores e tripsinização, tornariam disponíveis glicopeptídeos presentes nas células normais de uma forma oculta e que

seriam indispensáveis ao fenômeno de aglutinação. Estudos com inibidores indicaram que este glicopeptídeo continha resíduos terminais de N-acetilgalactosamina. A adição deste açúcar às células aglutinadas resultava na dissociação do agregado, demonstrando a reversibilidade da reação de hemaglutinação (*19*).

Sob o aspecto toxicológico as hemaglutininas despertam interesse no campo da Nutrição, pois são encontradas na maioria das sementes utilizadas como fonte protéica por grande parte da população mundial, particularmente as menos desenvolvidas (*61,62*). O seu papel na determinação do valor nutritivo de sementes é bastante controverti do. Já se demonstrou que as hemaglutininas são tóxicas se injetadas intraperitonealmente (*42,74*) ou se incluídas em dietas de animais de laboratório (*37,44*). Contudo, Turner & Liener (*110*), removendo seletivamente a hemaglutinina da soja por cromatografia de afinidade, mostraram que o extrato livre de hemaglutininas produzia essencialmente a mesma inibição do crescimento dos ratos alimentados com a farinha crua. Por outro lado Pusztai & Palmer (*85*), em experimentos semelhantes, mostraram que o extrato de sementes de "Kidney bean" (*P. vulgaris*), livre de hemaglutininas não era tóxico para ratos. Contudo, o material hemaglutinante mostrou ser capaz de reduzir o NPU de ratos alimentados com dietas de 5% de proteína, sugerindo que a atividade hemaglutinante e o princípio tóxi co estão presentes no mesmo componente.

Um possível mecanismo de toxicidade das hemaglutininas foi proposto por Jaffé & Camejo (*44*). Estes autores observaram *in vivo* uma significativa redução na absorção de nutrientes e *in vitro* uma diminuição de 50% na velocidade de absorção de glicose pela parede intestinal, quando ratos foram alimentados com preparações aglutinantes obtidas de "Caraotas negras" (*P. vulgaris*). Com base nestas evidências, propuseram que as hemaglutininas devem interagir com as células de parede intestinal, causando uma interferência não específica na absorção de nutrientes.

As diversas hipóteses propostas para explicar a função das hemaglu tininas na natureza baseiam-se em suas propriedades químicas e bio lógicas, observadas em laboratório. Em razão das especificidade de suas reações com carboidratos, Saint Paul (*97*) acredita que talvez estejam envolvidas no transporte e estocagem de polissacarídeos

nos vegetais. Devido a sua propriedade mitogênica poderiam funcionar como agentes controladores nas divisões celulares e na germinação das plantas, como sugerem Sharon & Lis (*99*). Não existem, todavia, evidências experimentais que suportem ou contrariem estas hipóteses.

Apesar da extrema semelhança das hemaglutininas com anticorpos, Boyd (*14*) acredita que sua capacidade de interagir com antígenos humanos é um fenômeno puramente acidental. Observações recentes parecem indicar que as lectinas estão envolvidas na defesa das plantas contra a invasão de bactérias patogênicas, como demonstraram Zalewski & Sequeira (*117*) para espécies virulentas de *Pseudomonas solanacearum*, que normalmente infectam o tabaco e a batata inglesa.

Outras evidências indicaram que as hemaglutininas poderiam estar envolvidas no processo específico de infecção de bactérias do gênero *Rhisobium* em leguminosas (*12*). Lindemann *et al.* (*63*) demonstraram que a hemaglutinina da soja apenas se associava às linhagens infectivas de *R. japonicum*, não tendo sido demonstrada qualquer reação com linhagens encontradas nos nódulos radiculares de outras leguminosas. Dazzo & Brill (*27*) observaram que anti-soros preparados contra raízes de trevo também reagiam com a linhagem infectiva de *R. trifolii* e vice-versa, demonstrando assim que o vegetal e a bactéria fixadora de nitrogênio possuíam antígenos comuns.

Metodologia e Detecção

As lectinas são geralmente glicoproteínas e encontram-se nos tecidos associadas a outros materiais protéicos, tornando muito difícil sua detecção por métodos puramente químicos. A metodologia para sua determinação baseia-se em suas propriedades químicas e biológicas: o efeito sobre as células sanguíneas, a interação com carboidratos ou a toxicidade a animais de laboratório.

A interação entre as moléculas da hemaglutinina com carboidratos presentes na superfície dos eritrócitos assemelha-se à reação de antígeno-anticorpo (*18,73*) sendo extremamente específica, muitas vezes ao nível de reconhecer isômeros anoméricos (*82*). Para a sua

determinação, todavia, esta interação é tratada como um simples processo de precipitação, uma indicação visível de que as células encontram-se agregadas, unidas pelas moléculas do agente aglutinante (*49*). Os métodos mais usuais para a determinação da atividade hemaglutinante consistem na titulação da hemaglutinina com suspensões de eritrócitos. O material a ser testado é diluído progressivamente em soro fisiológico e reagido com quantidades fixas de hemácias. O ponto final da titulação pode ser determinado visualmente (*94*) ou fotometricamente (*65*).

Nos métodos de determinação visual, métodos qualitativos e semi-quantitativos, a aglutinação pode ser observada macroscopicamente em tubos de ensaio (*49*) ou placas de aglutinação (*78*), ou em lâminas, sendo o aglutinado observado microscopicamente (*55*). O título hemaglutinante é geralmente definido como o inverso da maior diluição onde ocorreu aglutinação visível ou a quantidade em micrograma de proteína presente nesta diluição. A atividade específica hemaglutinante é expressa como o título por miligrama de proteína. Estes métodos não permitem a detecção de pequenas variações na atividade e apresentam problemas na reprodutibilidade dos resultados, entretanto são relativamente simples e rápidos exigindo pequena quantidade de material.

O método de determinação fotométrica, desenvolvido por Liener (*60*), baseia-se na medida da quantidade de células não sedimentadas após a hemaglutinação. São utilizadas hemácias de coelho, tripsinizadas, cuja concentração na suspensão utilizada no teste é convenientemente ajustada, de modo que os tubos controle registrem 0,5 de absorbância a 620nm. As medidas são feitas utilizando-se adaptadores especiais para os tubos de ensaio, contendo uma abertura de $1cm^2$, que permite que o feixe luminoso atravesse a camada intermediária da suspensão. Uma unidade de hemaglutinação (HU) foi definida arbitrariamente como a quantidade de material requerida para causar um decréscimo de 50% na absorbância em relação aos tubos controle. A atividade específica hemaglutinante é expressa em HU/mg de proteína. Este método embora mais preciso exige equipamento especial e grandes quantidades de material, não sendo utilizado em muitos laboratórios.

O efeito inibitório de açúcares é geralmente medido fixando-se tam

bém a concentração de lectina, sendo os resultados expressos em função da concentração do inibidor (µg/mℓ). Analogamente, uma unidade de inibidor é definida como a quantidade de inibidor necessária para provocar 50% de inibição ou a quantidade mínima requerida para inibir a aglutinação visível (*54*).

Baseando-se na capacidade da Concanavalina A precipitar polissacarídeos, So & Goldstein (*101*) estabeleceram um método para a sua determinação. A lectina foi precipitada pela reação com uma dextrana, determinando-se o nitrogênio do precipitado pela reação com a ninidrina. O mesmo procedimento, entretanto, não seria viável precipitando-se a hemaglutinina com eritrócitos intactos, uma vez que a quantidade de nitrogênio da hemaglutinina seria uma fração tão pequena do nitrogênio das hemácias que seria mascarado pelo erro experimental do método. Poderia ser utilizado com certa precisão suspensões de estroma de eritrócitos lavados, onde o nitrogênio inerte da hemaglobina seria eliminado (*49*).

A capacidade de certas lectinas estimularem a conversão de linfócitos em células blásticas pode ser estimada pela contagem, em microscópio, da porcentagem de células transformadas (*77*) ou pela velocidade de incorporação de precursores marcados nas moléculas de RNA e DNA (*22*). Entretanto, o aumento na síntese dos ácidos nucléicos nem sempre traduz todas as alterações morfológicas que ocorrem nos linfócitos (*96*), sendo aconselhável a utilização dos dois métodos simultaneamente.

O efeito tóxico das hemaglutininas pode ser medido por injeção intraperitoneal ou pela sua incorporação em dietas. Para os testes de toxicidade parenteral define-se uma unidade de toxidez em função da DL_{50}, a quantidade em miligrama de nitrogênio por quilograma de peso, que injetada intraperitonealmente em ratos de 55 a 65g, produz morte em 50% dos animais em 3 dias (*59*). Nos testes de toxicidade oral, hemaglutininas semi-purificadas são adicionadas a rações basais contendo 10% de proteína (*38*), sendo o ensaio realizado segundo os métodos clássicos de avaliação protéica propostos por Derse em 1958 (*28*). Os principais parâmetros considerados são o ganho de peso por dia e o tempo necessário para ocorrer 100% de mortalidade nos animais do grupo de ensaio.

Isolamento e Caracterização

Devido as suas diferentes propriedades, as hemaglutininas são utilizadas em estudos de diversas naturezas, requerendo muitas vezes a sua obtenção, em formas razoavelmente homogêneas (*11,99*). Contudo, sua purificação apresenta problemas não comumente encontrados na purificação de outras proteínas. As hemaglutininas são constituídas de múltiplas formas (*64,86*), estruturalmente muito semelhantes, que podem sofrer complexas reações de associação e dissociação, dificultando a purificação e a interpretação dos resultados (*25,70,88*).

Entre os métodos mais recomendados para o seu isolamento, estão aqueles que utilizam a cromatografia de afinidade (*69,10*). Nestas técnicas, que poderiam ser classificadas como cromatografia de deslocamento, tira-se proveito da capacidade das hemaglutininas ligarem-se específica e reversivelmente a açúcares. As vantagens que normalmente são atribuídas à cromatografia de afinidade são de permitir o isolamento em poucas etapas, proporcionando consequentemente altos rendimentos, e por ser uma técnica branda não causar efeitos drásticos sobre os componentes isolados (*24*).

Matsumoto & Osawa (*69*) descreveram o isolamento de várias hemaglutininas por cromatografia de afinidade, utilizando açúcares inibidores imobilizados em suporte de amido. Para a purificação da hemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*, foram utilizados glicopeptídeos obtidos de tiroglobulina ligados covalentemente à partículas de Sepharose 4B (Pharmacia), sendo o material retido deslocado pela eluição de tampão ácido. Rigas *et al.* (*93*), utilizaram a Concanavalina A ligada covalentemente a partículas de Agarose (Glycosylex-A, Miles), enquanto Bessler & Goldstein (*10*) recomendaram a utilização de ConA-Sepharose (Pharmacia), que emprega a Concanavalina A ligada covalentemente a partículas de Sepharose 4B. O deslocamento do material retido em ambos os casos foi feito pela eluição de solução de α-metil-D-manopiranosídeo, que é um potente inibidor da atividade da Concanavalina A.

Segundo Jaffé *et al.* (*43*), as hemaglutininas de *Phaseolus vulgaris* podem ser classificadas em 4 grupos, de acordo com sua especificidade para eritrócitos de diferentes animais, tendo sido demonstra-

do diferenças no comportamento cromatográfico, em DEAE-celulose, destas hemaglutininas (*47*). Já foram purificadas e caracterizadas somente algumas hemaglutininas de feijão, sendo encontrados dados bastante contraditórios na literatura, mesmo tratando-se de uma mesma variedade.

A hemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* mais estudada é a de "Red kidney bean", particularmente após as observações de Nowel, em 1960 (*77*), que esta lectina podia induzir linfócitos humanos a sofrerem divisão mitótica *in vitro*. Rigas & Osgood, em 1955 (*95*), desenvolveram uma série de métodos de purificação, baseados em precipitações sucessivas em álcool e sulfato de amônio. A preparação obtida mostrou ser uma mucoproteína, contendo 50% de carboidratos. Contudo, quando a precipitação com sulfato de amônio foi realizada em torno de pH 1,0 a hemaglutinina foi obtida livre de um polissacarídeo inativo, apresentando-se na forma de uma proteína que continha 14,6% de nitrogênio e 3,4% de substâncias redutoras, determinadas em função de glicose. Estes procedimentos são utilizados comercialmente na obtenção de preparações hemaglutinantes e mitogênicas desta variedade, como a "Phitohemagglutinin-P" (P-PHA) (Difico, Michigan).

Em 1964, Nordman *et al.*(*75*) observaram que a P-PHA podia, em maiores concentrações aglutinar também leucócitos. Os autores tentaram separar as atividades por métodos físico-químicos de separação, como DEAE-celulose e CM-celulose, não obtendo sucesso. Entretanto, através de estudos sorológicos, consistindo na adsorção da P-PHA com eritrócitos e leucócitos, estes autores propuseram a existência de duas formas puras. Uma eritroaglutinante (E-PHA), que podia também aglutinar leucócitos, formando aglutinados mistos, e uma leucoaglutinante (L-PHA). A atividade mitótica estaria presente em ambas as formas devido a sua propriedade leucoaglutinante.

Também em 1964, Rigas & Johnson (*94*) tentaram separar as atividades por cromatografia em estroma de eritrócitos, DEAE - celulose e Sephadex G-200. Não foi possível chegar-se a conclusões definitivas quanto a natureza do fator mitogênico, contudo os resultados da cromatografia em estroma de eritrócitos sugeriram a existência de mais de uma substância mitogênica, possuindo uma delas, também atividade eritroaglutinante. A hemaglutinina mostrou-se homogênea

por análise de ultracentrifugação, apresentando um coeficiente de sedimentação de 6,5S. Seu comportamento eletroforético foi estudado em gel de poliacrilamida indicando que a preparação era homogênea sendo constituída de uma banda larga e densa. A lectina apresentou um peso molecular de 128.000, calculado a partir dos dados de equilíbrio de sedimentação. Sua constante de difusão ($D_{20,w} = 4,8 \times 10^{-7} cm^2 s^{-1}$) foi calculada a partir da equação de Svedberg, substituindo-se os demais termos pelos valores determinados experimentalmente. A hemaglutinina apresentou um ponto isoelétrico em pH 6,5. Análises químicas indicaram que era deficiente em aminoácidos sulfurados, sendo rica em ácido aspártico, arginina, treonina e leucina. Alanina foi encontrada como o único aminoácido N-terminal presente na molécula.

Somente após 1969, foi que Weber (*112*), purificou e caracterizou a leucoaglutinina. Weber *et al.* (*113*) apresentam procedimentos para a purificação de ambas as lectinas, L-PHA e E-PHA e discutem comparativamente suas propriedades físico-químicas. O princípio básico para a separação das duas formas foi a cromatografia de troca iônica em SE-Sephadex C-50 (Pharmacia). A L-PHA foi eluída em pH 6,0, enquanto a E-PHA foi eluída em pH 8,0. Em estudos de equilíbrio de sedimentação em meio de Guanidina-HCl 5,8M encontrou-se que ambas as glicoproteínas apresentavam estruturas tetraméricas, possuindo o monômero um peso molecular de 30.000 - 31.000, contrariando os resultados de Rigas & Head (*92*), que afirmaram ser a E-PHA formada de 8 subunidades. Embora a L-PHA mostrasse homogênea por eletrofocalização em meio de uréia 8M e revelasse ser constituída de um único tipo de subunidade , a E-PHA mostrou ser um complexo de várias glicoproteínas de mais de um tipo de subunidade, sendo uma delas semelhante a subunidade da L-PHA, que lhe conferia atividade mitótica e leucoaglutinante.

Yachnin & Svenson (*116*) estudando o comportamento eletroforético da P-PHA afirmaram que a "região" biologicamente ativa era composta de 5 bandas de proteínas. Aquelas mais anódicas constituíam a L-PHA e as mais catódicas a E-PHA. Posteriormente, em 1975, o mesmo grupo (*71*) propôs a estrutura molecular da P-PHA como sendo formada de cinco glicoproteínas compostas de combinações de subunidades L e E de modo a serem possíveis as formas: L_4, L_3E_1, L_2E_2, L_1E_3, E_4.

Em 1975, Felsted *et al.* (*33*) confirmaram, através de estudos eletroforéticos, a existência das cinco glicoproteínas de mobilidades eletroforéticas muito próximas. Confirmou-se também que a eritroatividade estava relacionada com os componentes catódicos e leucoatividade com os componentes anódicos. Posteriormente, em 1977 (*58*), o mesmo grupo conseguiu separar estas proteínas por meio de cromatografia em SP-Sephadex (Pharmacia).

A estrutura protomérica proposta por Yachnin e seu grupo (*71,116*) para a P-PHA foi confirmada pela medida das atividades relativas das isolectinas e por estudos de recombinações *in vitro* das subnidades (*32*). A estrutura E_4 apresentou também uma baixa, porém mensurável capacidade de induzir linfócitos a sofrerem divisão mitótica, enquanto uma baixa eritroatividade foi observada em L_4. Estas observações sugerem que as interações das subunidades com o respectivo tipo de célula não é absolutamente específica, levando à suposição da existência de outras interações de natureza inespecífica.

A estrutura primária das subunidades L e E foi investigado por Miller *et al.* (*71*). A sequência N-terminal e C-terminal foi determinada mostrando pequenas variações para as duas subunidades. A porção de carboidratos de ambas as moléculas parece ser a mesma, consistindo em dois resíduos de glicosamina e seis ou sete resíduos de manose. O primeiro resíduo de glicosamina encontra-se ligado ao ácido aspártico (posição 12) na forma de 1-L-β-aspartamido(2-acetamido)-1,2-dideoxi-β-D-glicose. Os açúcares constituintes da P-PHA estão de acordo com os resultados de Rasänen *et al.* (*89*) que demonstraram ser manose e glicosamina os únicos açucares constituintes da leucoaglutinina cristalizada do "Red kidney bean".

Menor número de trabalhos são encontrados na literatura a respeito do isolamento e caracterização de hemaglutininas de outras variedades de *P. vulgaris* . Jaffé & Gaed, em 1959 (*45*), por meio de extração em solução de NaCl 1% e precipitações com sulfato de amônio em pH 6,0 obtiveram duas frações hemaglutinantes do "Black bean" (*P. vulgaris*). A primeira foi precipitada entre 55 e 70% de saturação que ao contrário do que havia observado Rigas & Osgood (*95*) para o "Red kidney bean", mostrou-se extremamente tóxica, sendo denominada Phaseolotoxina A. A segunda fração foi precipitada entre 70 e 100% de saturação, e embora apresentasse a mesma atividade hemaglu

tinante, não produzia o mesmo efeito tóxico (*40*). Posteriormente Jaffé & Hanning (*46*) purificaram e caracterizaram a Phaseolotoxina A como sendo homogênea, por eletroforese de fluxo livre em pH 8,6, tendo um peso molecular de 128.000, um coeficiente de sedimentação de 5,9S e um ponto isoelétrico em pH 4,9. Esta hemaglutinina revelou-se uma glicoproteína contendo 5,7% de carboidratos, que foram separados por cromatografia em papel, sendo manose e glicosamina seus principais açúcares, contendo ainda fucose, xilose e galactose.

A hemaglutinina do "Wax bean" (*P. vulgaris*) foi originalmente purificada por Takahashi *et al.* em 1967 (*109*), utilizando uma sequência de etapas envolvendo fracionamentos com sulfato de amônio (50-100% de saturação) e sucessivas cromatografias em DEAE-celulose e CM-celulose. A preparação obtida mostrou-se homogênea por eletroforese de disco em poliacrilamida, apresentando-se como uma banda densa e larga. Análises por ultracentrifugação confirmaram a homogeneidade da preparação, apresentando um coeficiente de sedimentação de 5,37S e um peso molecular de 132.000. Sua constante de difusão ($D_{20,w} = 3,7 \times 10^{-7} cm^2 s^{-1}$) foi calculada a partir da equação de Svedberg, substituindo-se os parâmetros determinados experimentalmente. A hemaglutinina apresentou um ponto isoelétrico em pH 5,5 e a análise de sua constituição de aminoácidos mostrou deficiência em aminoácidos sulfurados e predominância de ácido aspártico e serina. Sua constituição de carboidratos foi determinada por cromatografia gasosa, a partir de derivados de alditol, sendo manose e glicose seus principais açúcares, contendo ainda arabinose, galactose, fucose, xilose e glicosamina, sendo o aminoaçúcar determinado em analisador de aminoácidos.

Em 1973, Sela *et al.* (*98*) obtiveram a mesma hemaglutinina pelo mesmo procedimento e utilizando cromatografia em hidroxiapatita, conseguiram fracioná-la em três componentes, dois deles biologicamente ativos. A análise de aminoácidos dos componentes não mostrou diferenças significativas. Continham o mesmo teor de açúcares neutros e o mesmo peso molecular (125.000 $\pm$ 5.000) e eram formados de subunidades de peso molecular de 30.000, indicando para ambos uma estrutura tetramérica. Ambos componentes, biologicamente ativos, apresentaram atividade eritroaglutinante e mitogênica, sendo

também observado que causavam aglutinação de células mamárias transformadas com o carcinógeno químico dimetilnitrosamina. Concentrações extremamente baixas, da ordem de 0,2-0,5µg/mℓ, eram suficientes para aglutinar as células transformadas, enquanto que concentrações cem vezes maiores foram requeridas para aglutinar as células normais do mesmo tecido. Uma destas frações foi testada *in vitro* e mostrou-se capaz de inibir o desenvolvimento de tumores em animais de laboratório. As reações de aglutinação puderam ser inibidas em presença de fetuína, contudo, nenhum dos vários monossacarídeos testados à concentração de 1,0µg/mℓ mostraram efeito inibitório.

Estão representadas no quadro I, algumas propriedades de hemaglutininas purificadas, de diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris*.

Quadro I - Algumas propriedades de hemaglutininas isoladas de *Phaseolus vulgaris*.

Varied.	Subst.	M	pI	$s_{20,w}$	*a*	$D_{20,w}$	$\bar{\nu}$	f/f_o	Man	GlicN	Ref.
Red kidney bean	P-PHA	128.000	6,5	6,5 S		4,8 D					*(94,95)*
		128.400	6,5	7,05 S		5,08 D	0,738	1,255	8,02	2,39	*(93)*
	E-PHA	150.000	6,5	7,1 S			0,75	1,3			*(113)*
	L-PHA	140.000	5,0	6,8 S			0,75	1,3	6,8	3,1	
	L-PHA	126.000	5,1	6,87 S	48	4,91 D	0,728	1,45	7,34	2,84	*(89)*
	PHA-a'	83.000-91.000							10,0	3,2	*(25)*
White k. bean	D_3-alb	118.000	4,8;4,9	6,84 S		4,90 D	0,712	1,56	6,66	1,64	*(86)*
	Il-glb	119.700	5,15;5,65; 5,75	6,76 S			0,715		6,03	1,62	
Black bean	PHA-A	126.000-130.000	4,9	5,9 S			0,683		5,03	0,68	*(45,46)*
Wax bean	WBH	121.000-132.000	5,5	5,37 S		3,7 D	0,728		7,3	0,9	*(109)*
	F-III	125.000							8,0		*(98)*

Subst. = como designado pelos autores; M = peso molecular; pI = pH isoelétrico; $s_{20,w}$ = coeficiente de sedimentação, S = 10^{-13}s; *a* = raio de Stokes (Å); $D_{20,w}$ = constante de difusão, D = $10^{-7}cm^2s^{-1}$; $\bar{\nu}$ = volume específico parcial ($m\ell.g^{-1}$); f/f_o = quociente friccional; Man = açúcares neutros em manose (%); GlicN = aminoaçúcares em glicosamina (%).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram utilizadas sementes de feijão Rosinha G2 (*Phaseolus vulgaris, L.*), obtidas do Instituto Agronômico de Campinas, SP. As amostras foram moídas em moinhos de martelo, e trituradas em almofariz até passar em peneiras de 75 mesh.

As amostras de sangue bovino, obtidas do Instituto de Zootecnia da Secretaria de Agricultura, Nova Odessa, SP, foram recebidas em anticoagulante (citrato de sódio 3,85%), sendo armazenadas por duas semanas em solução de Alsever, preparada como descrito por Oliveira & Silva (*78*).

Reagentes

Os reagentes utilizados eram puros (p.a.) e de diferentes procedências: Baker, Fisher, Merck, Carlo Erba, Sigma, Ortec, LKB, etc.

Instrumental

Além dos utensílios de uso comum em laboratório como vidraria, estufas, dessecadores, banhos termostatizados, agitadores magnéticos, etc., os principais instrumentos utilizados foram:
Destiladores de Nitrogênio LAB CON CO.
Espectrofotômetros Perkin-Elmer Mod. 356 e Mod. 402.
Centrífuga Sorvall Mod. RC2-B
Ultracentrífuga Preparativa Beckman Mod. L5-75
Evaporador Rotatório Büchler

Potenciômetro Metrohm Herisav Mod. E500
Coletor Automático de Frações LKB Ultrorac 7.000
Liofilizador Virtis Mod. 10-146 MR-BA
Analisador Semi-automático de Aminoácidos Beckman Mod. 120 C
Balança Analítica Sauter Mod. 414/10
Balança Semi-analítica Sauter Mod. SD 1.000 T
Fonte de Alta Voltagem Ortec

Determinação de Proteína

A concentração de nitrogênio foi determinada pelo método de Kjeldahl, segundo AOAC (*6*), procedimento 2.23. O teor de proteína (%N x 6,25) foi expresso por 100g de amostra.

A concentração de proteína foi determinada pela reação do Biureto, segundo o método descrito por Villela *et al.* (*111*). As amostras foram reagidas com solução alcalina de cupritartarato de sódio, medindo-se a cor violácea do complexo formado a 540nm. Foram descontadas as absorbâncias de brancos do reagente e das diferentes amostras em igual volume de NaOH 1,5%. A absortividade do produto colorido foi calculada em função de albumina de soro bovino (Sigma).

A localização das proteínas eluídas das diferentes colunas cromatográficas, foi feita por medida da absorbância a 280nm, em cubetas de 1cm.

Determinação da Atividade Hemaglutinante

Alíquotas de sangue bovino foram centrifugadas a 600xg por 5 minutos para se eliminar o plasma. As hemácias obtidas foram lavadas 3 vezes com solução salina tamponada (Tampão Fosfato 0,01M pH 7,0 contendo 0,15M de NaCl) e resuspensas a 4% (v/v) em solução contendo 0,1% de tripsina bovina. Após incubação por 1 hora a 37°C, a suspensão foi centrifugada, descartando-se o sobrenadante. O sedimento foi lavado 3 vezes com solução salina a 4°C, resuspendendo-se no final a 4% de células (v/v).

Soluções das proteínas em estudo, contendo 1mg/mℓ foram sequencial

mente diluídas, obtendo-se 10-12 diluições. Volumes de 0,5mℓ de cada diluição e 0,2mℓ da suspensão a 4% de hemácias bovinas, tripsinizadas, foram aplicados em placas de aglutinação. Estas placas, especialmente construídas para este trabalho, eram de acetato de celulose, contendo 24 reservatórios hemisféricos de 2mℓ de capacidade. Após 50 minutos à temperatura ambiente, as placas foram agitadas com leves movimentos circulares e deixadas em repouso por mais 10 minutos. Após este tempo, os resultados foram interpretados de acordo com os seguintes padrões: (+ + + +) formação de grumo único, grande; (+ + +) formação de vários grumos grandes com poucos grumos pequenos; (+ +) vários grumos pequenos com poucas células livres; (+) vários grumos pequenos com muitas células livres; (-) células que se levantam de um botão liso (*78*).

O título hemaglutinante foi definido como o inverso da maior diluição capaz de promover aglutinação (+) nas condições do ensaio, sendo expresso por 1mg de proteína. A atividade hemaglutinante total (AT) representa o título/100g de sementes.

Extração e Fracionamento das Proteínas do Feijão Rosinha G2

As proteínas do feijão Rosinha G2 (*P. vulgaris*) foram extraídas e fracionadas como esquematizado na Fig. 1. As sementes moídas (lotes de 40g) foram suspensas em solução 0,5M de NaCl (200mℓ). Após 1 hora de agitação constante o sobrenadante foi separado por centrifugação a 70.000xg por 20 minutos a 4°C, sendo o resíduo re-extraído em 200mℓ de solução 0,5M de NaCl, por 1 hora. O resíduo final foi deixado por vários dias em dessecadores de sílica-gel, até peso constante, sendo então tomadas alíquotas para a determinação de proteínas (%N x 6,25). Os sobrenadantes foram reunidos em volume conhecido e dialisados contra água destilada a 4°C por 36 horas, com trocas de 6 em 6 horas. Um terço do dialisado foi liofilizado obtendo-se uma fração denominada extrato total (EXT), que contém todo o material extraído não dialisável. O volume restante foi centrifugado a 70.000 xg por 20 minutos a 4°C e separado em dois componentes. A fração insolúvel, que contém as globulinas (GLB), foi ressuspendida em água destilada e liofilizada. O sobrenadante, que contém as albuminas (ALB), foi decantado, filtrado e liofilizado.

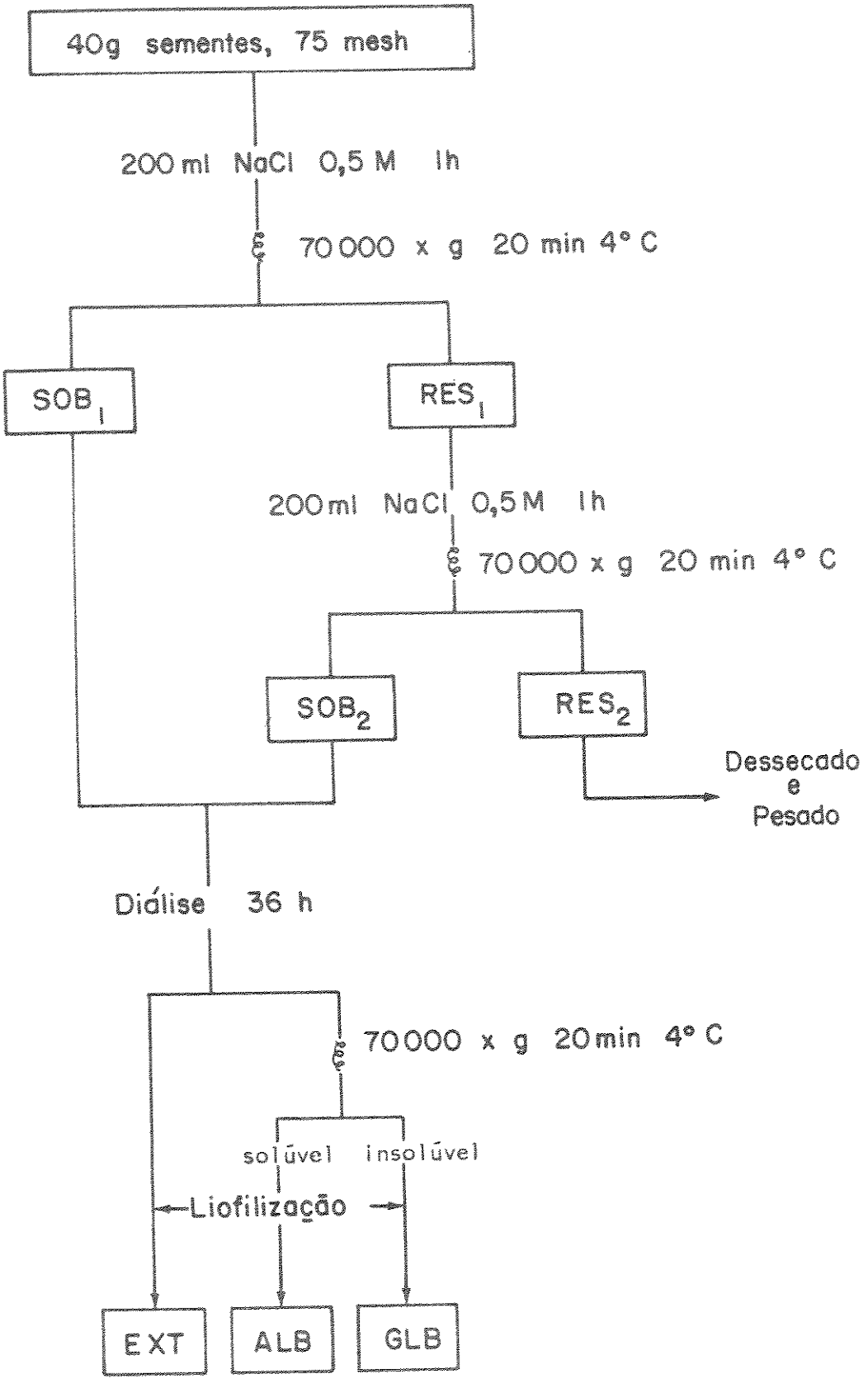

Fig. 1 - Esquema de extração e fracionamento das proteínas do feijão Rosinha G2 (*Phaseolus vulgaris*).

Separação por Cromatografia em Gel

O gel de Sephadex G-200 foi equilibrado em tampão fostato 0,01M pH 7,0 contendo 0,15M de NaCl e 0,01% de mertiolato. A cromatografia foi desenvolvida em colunas de 2,5 x 60cm, a uma velocidade de fluxo de 30mℓ/h, à temperatura ambiente. As amostras (40-160mg) foram dissolvidas em 10mℓ do mesmo tampão e centrifugadas a 70.000xg por 30 minutos a $4^{o}C$ para clarificação. Foram coletadas frações de 3mℓ, sendo as proteínas localizadas pela leitura da absorbância a 280nm em cubetas de 1cm. Volumes de 0,1-0,5mℓ das frações coletadas foram ensaiadas para reação de hemaglutinação, como descrito anteriormente.

Purificação das Hemaglutininas

Para a extração foram tomadas amostras de 4g de sementes moídas, suspendendo-se em 40mℓ de tampão específico para cromatografia de afinidade (tampão fosfato 0,01M contendo 0,15M de NaCl, 0,10mM dos seguintes sais: $CaCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$ e 0,01% de Mertiolato). Após 1 hora de agitação constante, à temperatura ambiente, o sobrenadante foi separado por centrifugação a 70.000 xg por 30 minutos, a $4^{o}C$ e dialisado contra o mesmo tampão por 36 horas, com trocas de 6 em 6 horas do tampão externo.

O extrato salino obtido teve sua concentração de proteína ajustada para 10mg/mℓ. Alíquotas idênticas de 30mℓ foram aplicadas em dois experimentos em colunas de Concanavalina A, ligada covalentemente a partículas de Sepharose 4B (ConA-Sepharose, Pharmacia).

A cromatografia foi desenvolvida à temperatura ambiente, a uma velocidade de fluxo de aproximadamente 100mℓ/h. Foram coletadas frações de 8mℓ, registrando-se a absorbância a 280nm para localização das proteínas. Após a eluição de 400mℓ do tampão específico, o material retido na coluna foi deslocado pela eluição de uma solução de 1% de α-metil-D-manopiranosídeo (Pfanstiehl), no mesmo tampão. Este material foi reunido, dialisado e liofilizado, sendo purificado, sequencialmente por cromatografia em gel de Sephadex G-200 como descrito anteriormente. Foram realizadas duas separações, apli-

cando-se em cada uma 40mg da amostra. As preparações obtidas foram reunidas, dialisadas e liofilizadas, sendo estocadas a -20°C.

Foram preparadas soluções das proteínas obtidas no curso do isolamento (1mg/mℓ) para a determinação da atividade hemaglutinante (Título/mg).

Eletroforese de Disco em Gel de Poliacrilamida

Foi realizada pelo método de Davis (*26*), ligeiramente modificado (*36*), utilizando-se tubos verticais (0,5 x 7,0 cm) contendo 8% de poliacrilamida. A eletroforese foi desenvolvida em tampão Tris-glicina 5mM, pH 8,4, contendo por litro duas gotas de azul de bromofenol em solução a 0,01%. Aplicou-se uma corrente de 5mA/tubo, sendo interrompida quando a banda do corante atingiu 0,5cm da extremidade inferior do gel. Os géis foram retirados dos tubos e então corados por imersão em solução a 1% de amido Schwartz preparada em ácido acético a 7%, descorando-se por sucessivas lavagens dos géis no mesmo ácido. A mobilidade relativa dos componentes separados foi calculada em função do azul de bromofenol.

Para a pesquisa da atividade hemaglutinante, géis não corados, obtidos paralelamente, foram cortados sendo as proteínas eluídas, ensaiadas para a reação de hemaglutinação, como descrito anteriormente.

Focalização Isoelétrica em Gel de Poliacrilamida

O ponto isoelétrico da hemaglutinina purificada foi determinado segundo a técnica descrita por Wrigley (*115*). Amostras de 100µg foram misturadas aos géis (0,5 x 7,0cm) contendo 7,3% de poliacrilamida 0,016% de anfólitos, (Ampholine LKB 8141). Foi aplicada uma corrente de 2mA/tubo, sendo mantida por 5 horas pelo aumento gradativo da tensão até 350V. Após este tempo, os géis foram retirados dos tubos e cortados em secções de 0,5cm, sendo deixados em 1mℓ de água destilada por uma noite a 4°C. O pH foi determinado potenciometricamente, dialisando-se em seguida as soluções contra salina tam

ponada por 48h a 4°C, para a pesquisa da atividade hemaglutinante. Géis obtidos paralelamente foram corados com "Coomassie Brillant Blue" R250, após tratamento com ácido tricloracético a 5%. Foi medida a distância das proteínas precipitadas à extremidade negativa do gel, multiplicando-se por um fator, L_o/L, determinado pela relação entre o comprimento inicial do gel e o seu comprimento após o procedimento de coloração. O ponto isoelétrico dos componentes separados foi calculado pelo gráfico do pH x comprimento inicial do gel.

Sedimentação em Gradiente Linear de Densidade

Foram obtidos gradientes de concentração de sacarose (5-20%)para a determinação do coeficiente de sedimentação e peso molecular da hemaglutinina purificada, segundo o método descrito por Martin & Ames (*68*). Foi utilizada a desidrogenase lática de músculo cardíaco de bovino (Sigma), de coeficiente de sedimentação, $s_{20,w}$ = 7,4S e peso molecular de 140.000, (*81*), como padrão interno. Amostras de 0,25mg da hemaglutinina purificada e 0,10mg do padrão, contidos em 0,1mℓ da mesma solução, foram aplicadas ao menisco de gradientes de 5mℓ. Centrifugou-se a 175.000 xg por 15 horas a 4°C em rotores SW 40 utilizando-se uma centrífuga Beckman Mod. L5.75. Após a sedimentação os tubos foram perfurados na extremidade inferior, sendo coletadas frações de aproximadamente 0,2mℓ. A enzima, padrão, foi localizada pela reação de oxidação do lactato em meio alcalino (*53*). Foram misturados em cubetas de 1cm 2,7mℓ de tampão glicina-semicarbazida 0,2M pH 9,5; 0,30mℓ de lactato de cálcio 5mM; 0,30mℓ de solução de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo 3mM, forma oxidada, e 0,05mℓ das frações coletadas. Imediatamente após a adição da enzima mediu-se o aumento da absorção a 340nm em função do tempo utilizando-se o expectrofotômetro Perkin-Elmer Mod. 356. A atividade enzimática, expressa em UT/mℓ, foi calculada a partir das inclinações das curvas obtidas, multiplicadas por um fator (f=6,0), determinado pelos parâmetros do instrumento (*23*). A atividade hemaglutinante foi determinada misturando-se 0,1mℓ das frações coletadas em 0,4mℓ de salina tamponada, juntando-se 0,2mℓ de uma suspensão a 4% de hemácias bovinas tripsinizadas. A aglutinação foi observada após 1 hora à

temperatura ambiente e os resultados expressos pelos símbolos convencionais de concentração (+) a (+ + + +). A relação das distâncias dos picos das proteínas até o menisco (L) com os coeficientes de sedimentação ($s_{20,w}$) e pesos moleculares (M) foi dada por:

$$\frac{L_{HA}}{L_{LDH}} = \frac{s_{20,w,HA}}{s_{20,w,LDH}} = \left(\frac{M_{HA}}{M_{LDH}}\right)^{2/3} \qquad \text{(Eq. I)}$$

Determinação de Parâmetros Moleculares por Cromatografia em Gel

Os geis de Sephadex G-200 foram equilibrados em salina tamponada , segundo método de Oliveira & Silva (*78*). As colunas (2,5 x 60 cm) foram calibradas pela eluição de proteínas de peso molecular conhecido. Foram utilizados: azul de dextrano (Pharmacia), 2.000.000 (*34*); desidrogenase lática de músculo cardíaco de bovino (Sigma) , 140.000 (*81*); albumina de soro bovino (Sigma), 67.000 (*87*); pepsina de mucosa estomacal de suíno (Calbiochem), (*87*); inibidor de tripsina de *Phaseolus lunatus* (Sigma), 9.000 (*48*).

As amostras (5mg) foram dissolvidas no mesmo tampão e cromatografadas nas mesmas condições descritas (4 experimentos). As frações foram lidas a 280nm, procedendo-se em seguida a ensaios específicos , para localização dos padrões. A desidrogenase lática foi ensaiada pela reação de oxidação de lactato em meio alcalino (*53*), a pepsina foi localizada pela digestão de hemoglobina desnaturada (*5*) e o inibidor de tripsina segundo método de Kunitz, modificado por Kakade *et al*. (*50*).

O peso molecular (M) da hemaglutinina purificada e dos diferentes componentes separados das frações EXT, GLB e ALB foram determinados pela relação empírica proposta Whitaker (*114*):

$$\log_{10} M = a + b \; V_e/V_o \qquad \text{(Eq. II)}$$

onde, V_o = volume externo do gel, determinado em função do azul de dextrano; V_e = volume de eluição dos componentes; os coeficientes a e b foram determinados a partir dos pontos experimentais por análise de regressão (*104*).

Enquanto os pesos moleculares foram obtidos de uma relação empírica (*114*), o raio molecular de Stokes da hemaglutinina purificada foi determinada com base no fundamento teórico proposto por Ackers (*2*). Assume-se que microregiões do volume não excluído do gel estão distribuídas aleatoriamente, com respeito aos tamanhos moleculares que podem acomodar. Assim, a fração do volume penetravel por um dado soluto de raio a é a fração $\phi(a)$ disponível a esta molécula mais microregiões similares, disponíveis à moléculas maiores (K_d). Assim, matematicamente, K_d é definido como a função de erro complementar da cruva gaussiana de distribuição:

$$\sigma = K_d = \text{erfc}\left[\frac{a - a_o}{b_o}\right] = 1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{(a-a_o)/b_o} e^{-a^2} da \qquad \text{(Eq. III)}$$

As constantes a_o e b_o foram determinadas por análise de regressão (*104*), através de medidas de K_d para padrões de raois conhecidos (*102, 87*).

O coeficiente de distribuição K_d, a fração do volume interno disponível para a distribuição do soluto, foi obtido experimentalmente pela relação (*34*):

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i} = \frac{V_p\ C_p}{V_i C} = \sigma \qquad \text{(Eq. IV)}$$

sendo,

$$V_i = V_t - (V_g + V_o) \qquad \text{(Eq. V)}$$

e

$$V_g = \frac{V_t}{B \times d} \qquad \text{(Eq. VI)}$$

onde,

K_d = coeficiente de distribuição = σ

V_p = volume penetrável no gel

C_p = concentração do soluto na região de penetração
V_i = volume de embebição do gel
C = concentração do soluto no volume excluído
V_e = volume de eluição do componente
V_o = volume externo
V_t = volume total da coluna
B = volume da partícula de Sephadex seca
d = densidade do Sephadex seco

Os experimentos foram realizados em colunas cilíndricas de 2,5 x 60 cm. Os parâmetros de Sephadex G-200, $B = 30 m\ell . g^{-1}$ e $d = 1,65 g . m\ell^{-1}$ são dados do fabricante, segundo Fisher (*34*).

Em uma dada temperatura T, numa solução diluída de viscosidade η, o raio molecular de Stokes a, relaciona-se com a constante de difusão livre $D_{20,w}$, pela equação deduzida por Einstein em 1905, dada por Moore (*67*):

$$D_{20,w} = \frac{kT}{6\pi\eta a} \qquad \text{(Eq. VII)}$$

Assumindo, portanto, que a difusão limitada pelos poros dos geis se aproxima da constante de difusão livre, $D_{20,w}$ foi determinada para a hemaglutinina pela equação VII.

Determinou-se o volume específico parcial da hemaglutinina $\bar{\nu}$, a partir de seu peso molecular M, seu coeficiente de sedimentação s e sua constante de difusão D, aplicando a equação de Svedberg para uma diluição infinita, dada por Malher (*66*):

$$M = \frac{RTs}{D\ (1 - \bar{\nu}\rho)} \qquad \text{(Eq. VIII)}$$

Foi obtida alguma informação sobre o comportamento hidrodinâmico da hemaglutinina, determinando-se seu quociente friccional f/f_o, pela equação de Einstein - Smoluchowski, dada por Springall (*105*):

$$\frac{f}{f_o} = \frac{kT}{6\pi\eta D} \left(\frac{4\pi N_A}{3M\bar{\nu}} \right)^{1/3} \qquad \text{(Eq. IX)}$$

onde,
f = coeficiente friccional da molécula
f_o = coeficiente friccional se esta é completamente esférica

k = constante de Boltzman
T = temperatura absoluta
η = viscosidade do meio
N_A = número de Avogadro
M = peso molecular
$\bar{\nu}$ = volume específico parcial

O valor determinado para o quociente friccional f/f_o, foi interpretado pelo diagrama de Oncley, dado por Springall (*105*), que forneceu o grau de hidratação máximo da proteína e a relação de seus eixos axiais a/b, assumindo-se modelos de elipsóides de revolução.

Determinação da Absortividade Específica

Para a determinação da absortividade específica a 280nm da hemaglutinina purificada foram preparadas soluções em salina tamponada, sendo a concentração de proteína determinada pelo método do Biureto. As soluções contendo 1mg/mℓ foram diluídas progressivamente, medindo-se a absorbância em cubetas de 1cm. As medidas foram feitas em espectrofotômetro de duplo feixe, contra brancos do mesmo tampão. Os resultados obtidos experimentalmente foram levados à equação clássica que descreve a lei de Bouguer-Beer, deduzida por Strong em 1952 (*107*), baseado na teoria quântica de radiação:

$$A = abc \qquad \text{(Eq. X)}$$

Definiu-se como absortividade específica a, a absortividade calculada para medidas de absorbância, feitas em cubetas de 1cm b, de soluções contendo 1mg/mℓ do material absorvente c.

Foram medidos espectros de absorção da hemaglutinina purificada, em solução salina tamponada (tampão fosfato 0,01M pH 7,0, contendo 0,15M de NaCl) e solução de NaOH 0,1N, na faixa de comrpimento de onda de 250 a 320nm. O espectro medido em solução alcalina foi utilizado para o cálculo do teor de triptofânio na amostra, segundo o método de Bencze & Schmid (*9*). Foi traçada uma reta tangente aos picos de absorção a 278 e 290nm, sendo o valor numérico desta tangente correlacionado com a relação molar de tirosina/triptofânio.

Determinação de Carboidratos

Os açúcares neutros totais foram determinados pelo método de Dubois *et al.* (*30*), utilizando 50mg de fenol e H_2SO_4, d = 1,84. Os resultados foram expressos em função de D-manose. Os aminoaçúcares foram determinados juntamente com os aminoácidos e expressos em função de glicosamina.

Determinação de Aminoácidos

Amostras de 3mg da hemaglutinina purificada foram hidrolisadas em aproximadamente 12mℓ de HCl 6N por 24 horas a 110°C. Após este tempo, as soluções dos aminoáciso foram evaporadas em evaporador rotatório, à temperaturas inferiores a 40°C. O resíduo foi dissolvido em volume de tampão citrato pH 2,2, suficiente para se obter o equivalente a 1mg de proteína original por mililitro. A composição em aminoácidos foi determinada em analisador semi-automático Beckman Mod. 120C segundo o método de Spackman *et al.* (*103*), sendo os resultados expressos por 100g de proteína, determinada por Biureto.

RESULTADOS

Extração e Fracionamento

Os resultados da extração e fracionamento inicial aplicados ao feijão Rosinha G2 estão apresentados no quadro II. A extração em solução de NaCl 0,5M dissolveu 78,7% do nitrogênio total das sementes. O extrato salino bruto foi dialisado contra água destilada, fracionando as proteínas quanto a sua solubilidade. Uma alíquota do dialisado foi separada e liofilizada, obtendo-se uma fração denominada extrato total (EXT), que continha 78,0% de proteína (%N x 6,25). Foi recuperada nesta fração 93,5% do nitrogênio extraído, sugerindo que 6,5% do mesmo deve ser dialisável. O volume restante foi centrifugado, recuperando-se na fração solúvel, que contém as albuminas (ALB), 24,8% do nitrogênio total das sementes. Esta fração apresentou uma pigmentação amarelada e continha 65,6% de proteína (%N x 6,25). O precipitado, fração globulina (GLB) após liofilização, apresentou 85,7% de proteína (%N x 6,25) e uma recuperação de 47,0% do nitrogênio total das sementes.

Soluções das proteínas obtidas, contendo 1mg/mℓ foram sequencialmente diluídas para a titulação das hemaglutininas. O título foi definido como o inverso da maior diluição onde ocorreu aglutinação visível. A atividade hemaglutinante apresentou uma maior tendência em concentrar-se na fração solúvel, sendo observado aglutinação na fração ALB ao nível de 3,9µg/mℓ.

Quadro II - Extração, fracionamento e recuperação das proteínas e da atividade hemaglutinante das sementes do feijão Rosinha G2.

Material	Rendimento[a] (%)	Proteína[b]		Atividade Hemaglutinante	
		g/100g sementes	Recuperação (%)	Título/mg[c]	Atividade Total[d] (x 10^{-6})
Sementes	100,0	23,4	100,0		
Extrato Total	21,7	16,9	72,2[e]	128	2,2
Albuminas	8,9	5,6	24,8	256	1,5
Globulinas	12,8	11,0	47,0	64	0,7
Resíduo Insolúvel	71,8	4,0	17,0		

[a] Cálculo aproximado em p/p

[b] %N x 6,25

[c] Maior diluição de 1mg de proteína, capaz de aglutinar os eritrócitos bovinos, tripsinizados.

[d] Título por 100g de sementes.

[e] Recuperação após diálise do extrato. Por diferença da recuperação do extrato salino bruto, 78,7-72,2 = 6,4%, tem-se, aproximadamente, o nitrogênio dialisável.

Separação por Cromatografia em Gel

As proteínas do feijão Rosinha G2 foram fracionadas em dois componentes hemaglutinantes por diferença de solubilidade em meios de baixa força iônica. Para uma melhor compreensão destas frações, o extrato salino bruto e as frações albumina (ALB) e globulina (GLB) foram separadas pelo tamanho molecular de seus constituíntes, por cromatografia em gel de Sephadex G-200.

Foram cromatografados, nas mesmas condições, padrões de peso molecular conhecido. Suas posições de eluição V_e/V_o, foram relacionadas com o logaritimo de seus pesos moleculares (Fig. 2).

A seguinte equação empírica (*114*) foi obtida a partir dos pontos experimentais, por análise de regressão (*104*):

$$\log_{10} M = 6,237 - 0,8410\ V_e/V_o \qquad \text{(Eq. XI)}$$

onde,

V_e = volume do pico de eluição

V_o = volume excluído do gel, determinado em função de azul de dextrano, V_o = 95,1mℓ.

Assim, substituindo-se os volumes de eluição V_e, dos picos obtidos nas separações cromatograficas, caracterizou-se o extrato bruto e as frações albumina e globulina pelo peso molecular de seus constituintes.

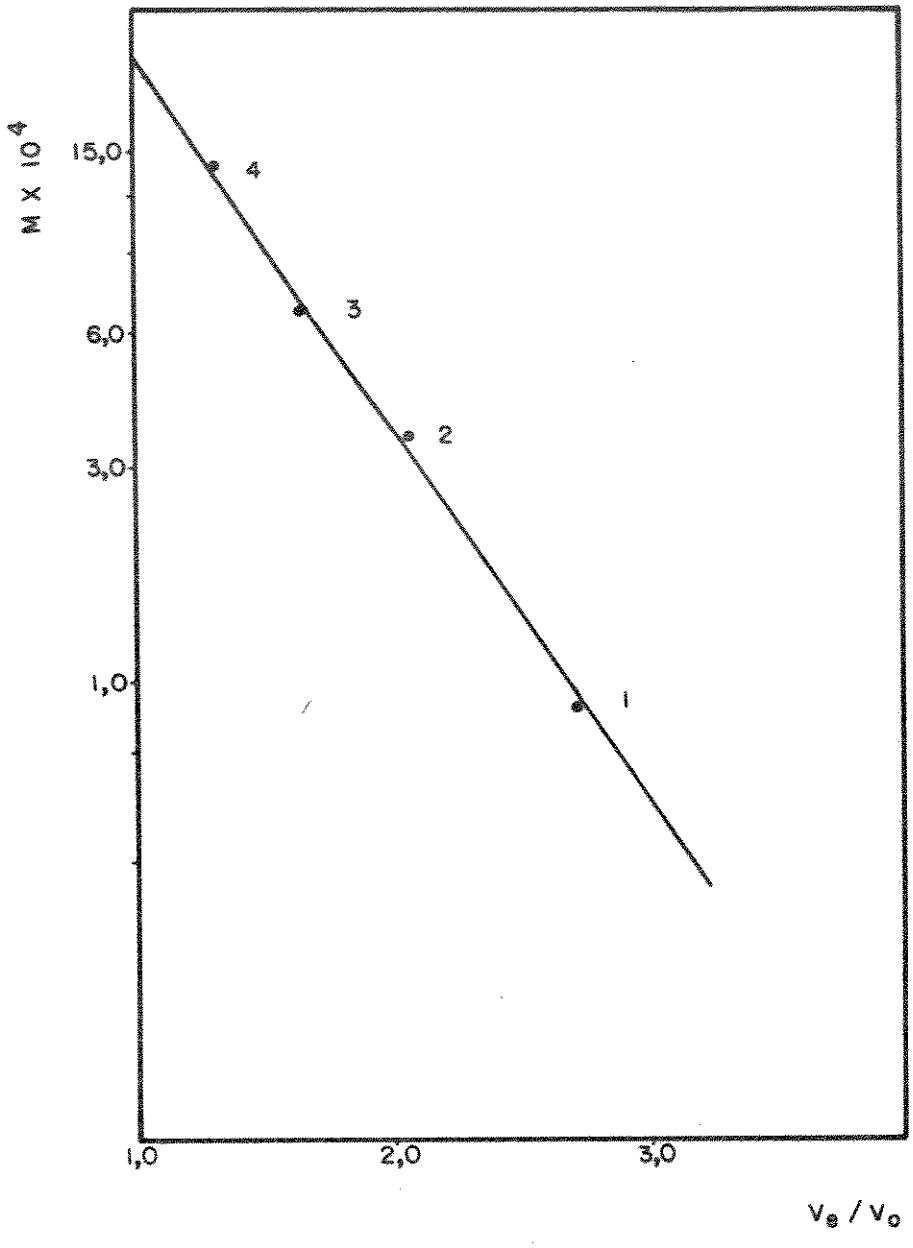

Fig. 2 - Cromatografia em Sephadex G-200 de proteínas de peso molecular conhecido. 1. Inibidor de Tripsina de *Phaseolus lunatus*, 9.000; 2. Pepsina de mucosa estomacal de suíno, 35.000; 3. Albumina de soro bovino, 67.000; 4. Desidrogenase lática de músculo cardíaco de bovino, 140.000. A melhor reta foi encontrada por regressão numérica: $\log_{10} M = 6,237 - 0,8410\ V_e/V_o$.

A figura 3 representa o cromatograma obtido pela eluição do extrato salino bruto em colunas de Sephadex G-200, equilibrado em tampão fosfato 0,01M, pH 7,0, contendo 0,15M de NaCl. Foram separados quatro componentes, tendo o primeiro EXT-α, um peso molecular superior a 200.000. O principal EXT-β, parece conter proteínas de peso molecular na faixa de 150.000 a 50.000. O componente parcialmente resolvido EXT-γ, foi separado em 30.000 e o de menor peso molecular EXT-δ, que contêm um material de pigmentação amarelada, na faixa de 10.000. A atividade hemaglutinante aparece no componente EXT-β e apresenta um máximo, aproximadamente, em 135.000.

A figura 4 mostra a separação da fração globulina em Sephadex G-200. três componentes foram parcialmente resolvidos. Um primeiro, denominado GLB-α foi eluído acima de 200.000, um segundo GLB-β em 150.000 e um terceiro e principal componente da fração GLB-γ que apresentou um peso molecular na faixa de 100.000. A atividade hemaglutinante, que aparece no componente GLB-β apresenta um máximo próximo a 140.000.

A fração albumina foi separada em cinco componentes, quando cromatografada no mesmo gel. O primeiro ALB-α, apresentou um peso molecular superior a 200.000 e o segundo ALB-β, foi eluído na faixa de 140.000. Foram ainda separados os componentes ALB-γ em 90.000 , ALB-δ em 50.000 e ALB-ε em torno de 30.000. A atividade hemaglutinante foi detectada principalmente no componente ALB-β, apresentando um pico em 130.000.

Os componentes hemaglutinantes obtidos das separações cromatográficas das frações EXT, GLB, ALB, figuras 3 a 5, foram coletados, dialisados e liofilizados. Foram preparadas soluções destes componentes para a determinação da atividade hemaglutinante. A interpretação dos resultados foi dificultada pela acentuada perda da atividade hemaglutinante, particularmente nas preparações obtidas do extrato bruto e da fração GLB.

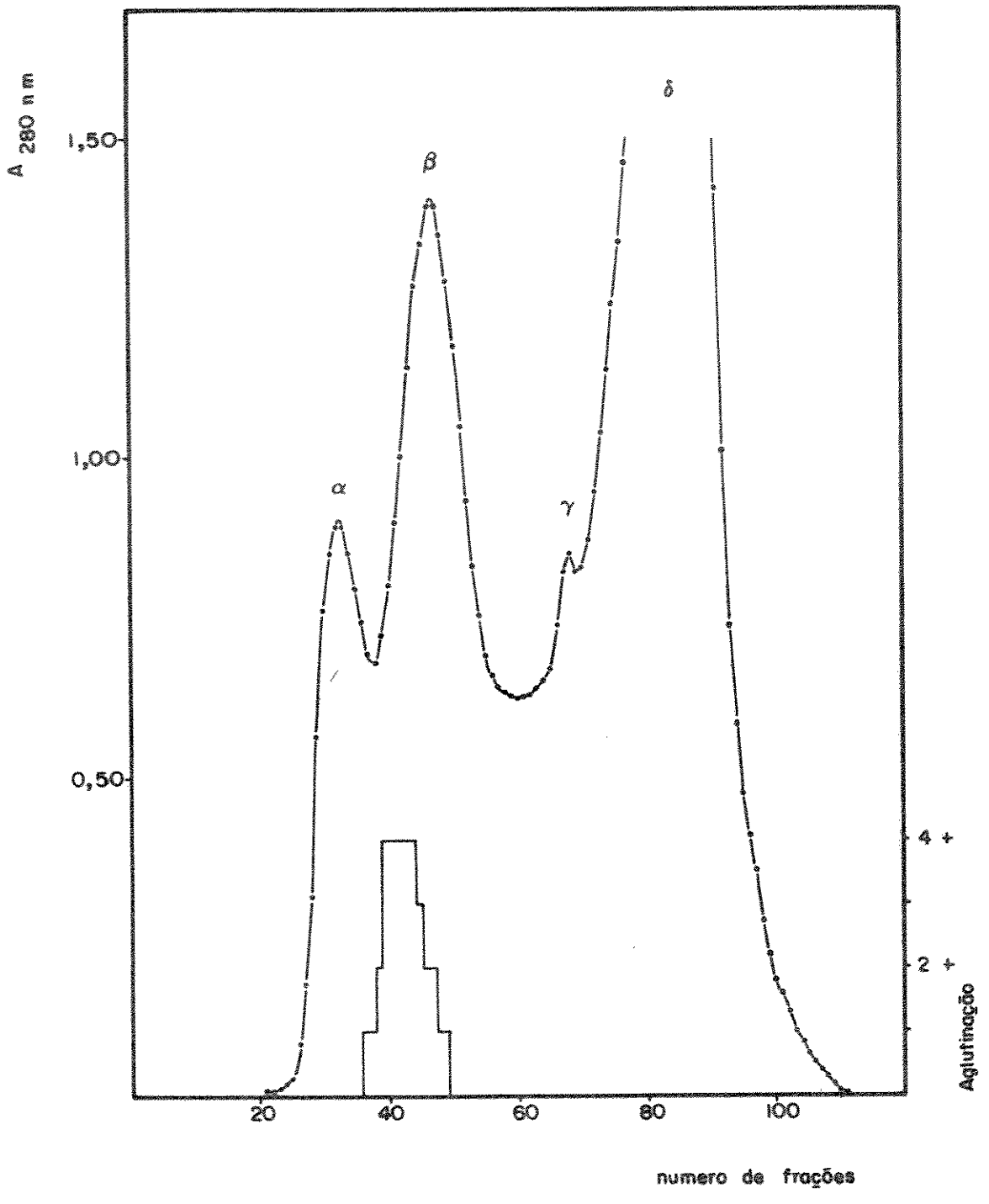

Fig. 3 - Separação por cromatografia em gel. Extrato salino bruto (180mg). Colunas (2,5 x 60 cm) de Sephadex G-200, equilibrada em tampão fosfato 0,01M, pH 7,0, contendo 0,15M de NaCl. Foram coletadas frações de 3mℓ, a uma velocidade de fluxo de 30mℓ/h. As frações foram lidas a 280nm, em cubetas de 1cm e ensaiadas para a atividade hemaglutinante (alíquotas de 0,1mℓ).

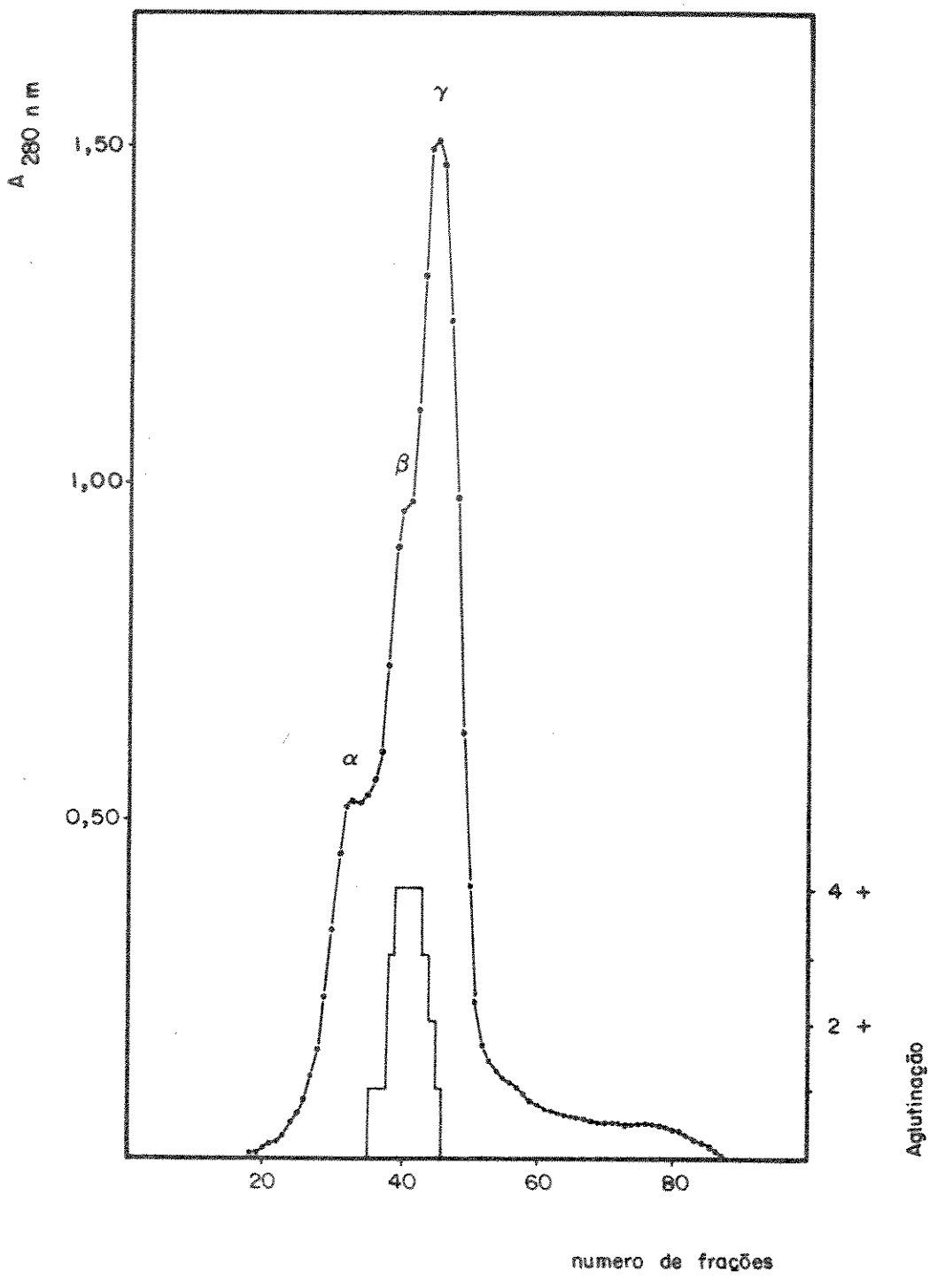

Fig. 4 - Separação por cromatografia em gel. Fração GLB (80mg). Colunas (2,5 x 60 cm) de Sephadex G-200, equilibrada em tampão fosfato 0,01M, pH 7,0, contendo 0,15M de NaCl. Foram coletadas frações de 3mℓ, a uma velocidade de fluxo de 30mℓ/h. As frações foram lidas a 280nm, em cubetas de 1cm e ensaiadas para a atividade hemaglutinante (alíquotas de 0,1mℓ).

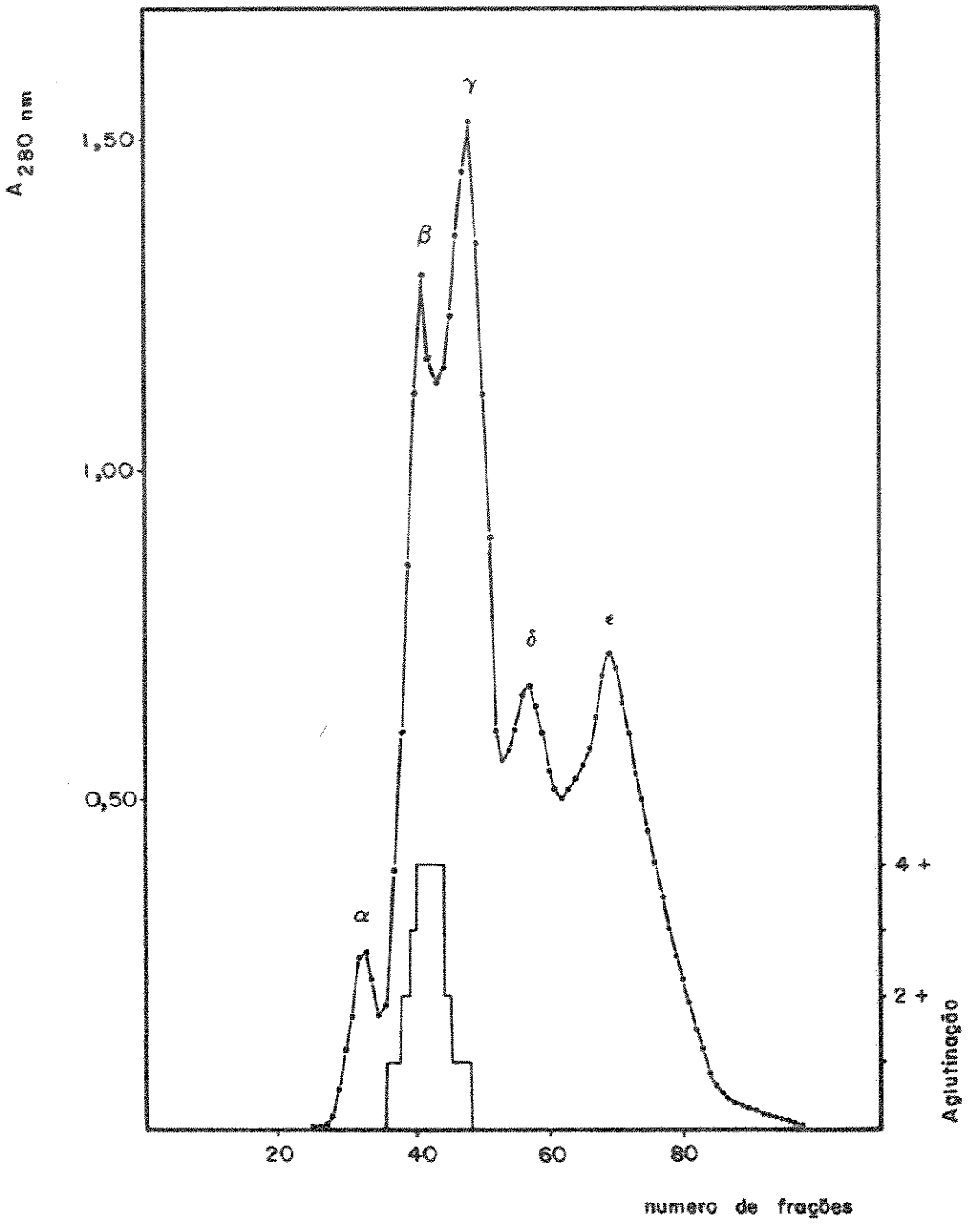

Fig. 5 - Separação por cromatografia em gel. Fração ALB (100mg). Colunas (2,5 x 60 cm) de Sephadex G-200, equilibrada em tampão fosfato 0,01M, pH 7,0, contendo 0,15M de NaCl. Foram coletadas frações de 3mℓ, a uma velocidade de fluxo de 30mℓ/h. As frações foram lidas a 280nm, em cubetas de 1cm e ensaiadas para a atividade hemaglutinante (alíquotas de 0,1mℓ).

Purificação das Hemaglutininas

Foram obtidos novos extratos das sementes em tampão apropriado para cromatografia de afinidade. A diálise do extrato contra o mesmo tampão, eliminou grande parte de um material pigmentado e fortemente redutor. O extrato dialisado foi clarificado por ultracentrifugação a 70.000 x g, descartando-se um precipitado de aspecto gelatinoso. Diluiu-se o extrato para 10mg de proteína por mililitro do tampão, aplicando-se duas alíquotas de 30mℓ em colunas de ConA-Sepharose. A Fig. 6 mostra um perfil típico da purificação por cromatografia de afinidade. Nenhuma atividade hemaglutinante foi detectada no primeiro componente eluído. O material deslocado pela solução de α-metil-D-manopiranosídeo, componente CII-Af, após liofilização, apresentou uma atividade hemaglutinante igual a 512 (Título/mg). Esta preparação foi sequencialmente purificada por cromatografia em gel de Sephadex G-200 (Fig. 7). A atividade hemaglutinante foi eluída em um único componente, CII-β, sendo o conteúdo dos tubos de 37 a 44 reunido, dialisado e liofilizado. Apresentou uma atividade hemaglutinante igual a 1024 (Título/mg).

O quadro III mostra um resumo do curso da purificação das hemaglutininas do feijão Rosinha G2. De 4g de sementes obteve-se 38,6mg da hemaglutinina purificada, sendo a recuperação representada por 100g de amostra. O teor de proteína no extrato dialisado foi determinado por Biureto. O cálculo da recuperação de proteína para os componentes CII-Af e CII-β foi feito utilizando-se a absortividade específica, $a_{280} = 1{,}12 mℓ.mg^{-1}.cm^{-1}$, calculada em função do Biureto para a preparação final obtida (*cf.* pag. 59). O título hemaglutinante, determinado após diálise e liofilização dos componentes obtidos de cada separação cromatográfica, representa o inverso da maior diluição de 1mg, de proteína onde ocorreu aglutinação visível. A atividade hemaglutinante total foi calculada para 100g de sementes.

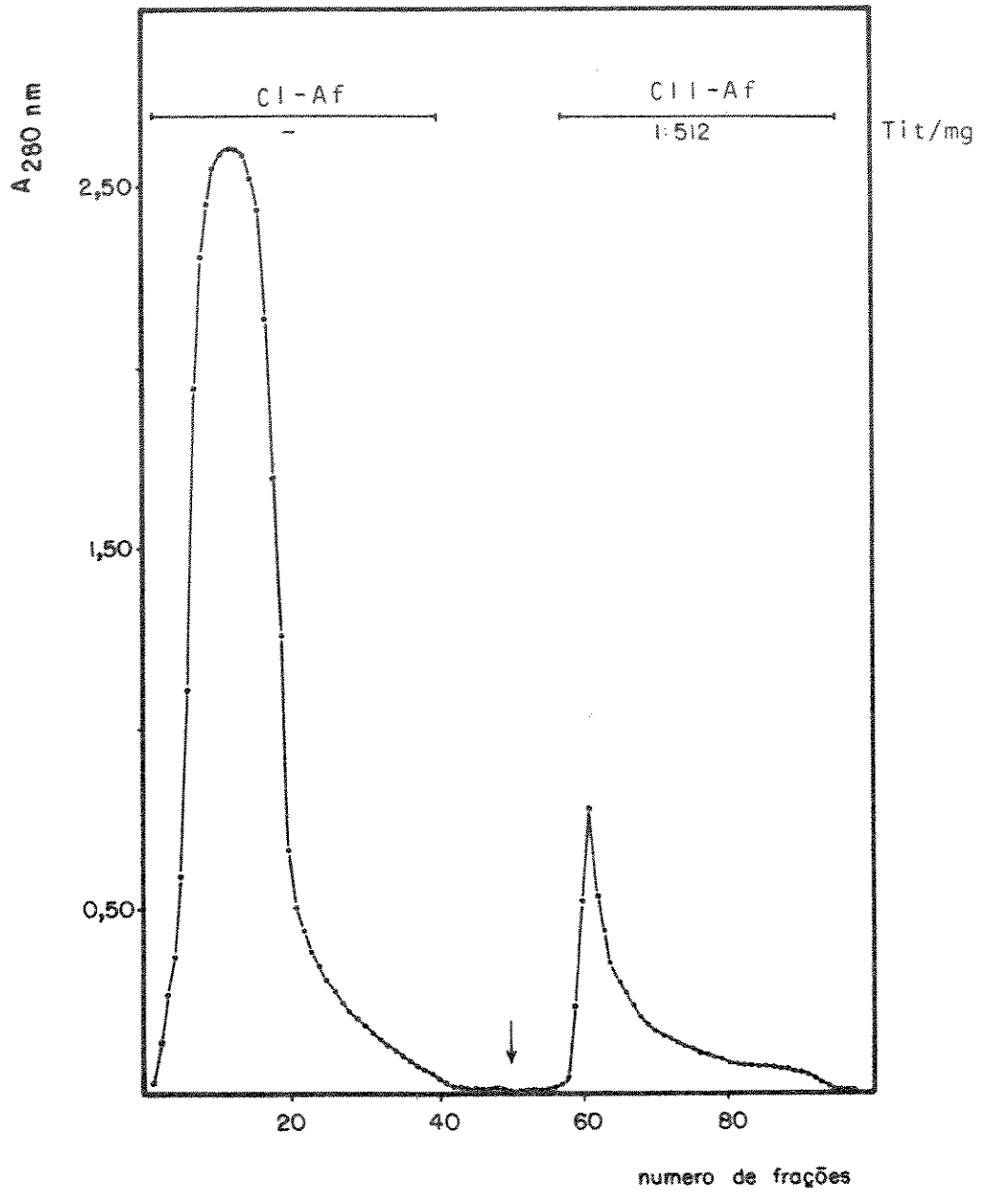

Fig. 6 - Separação por cromatografia de afinidade. Colunas de ConA-Sepharose (2,5 x 10 cm). Aplicou-se 30mℓ do extrato, contendo 10mg de proteína por mililitro do tampão eluente (tampão fosfato 0,01M, pH 7,0, contendo 0,15M de NaCl e 0,10mM dos seguintes sais: $CaCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$). Foram coletadas frações de 8mℓ, a uma velocidade de fluxo de 100mℓ/h. O material retido foi deslocado (flecha) pela eluição do mesmo tampão, contendo α-metil-D-manopiranosídeo (10mg/mℓ). As frações foram lidas a 280nm em cubetas de 1cm.

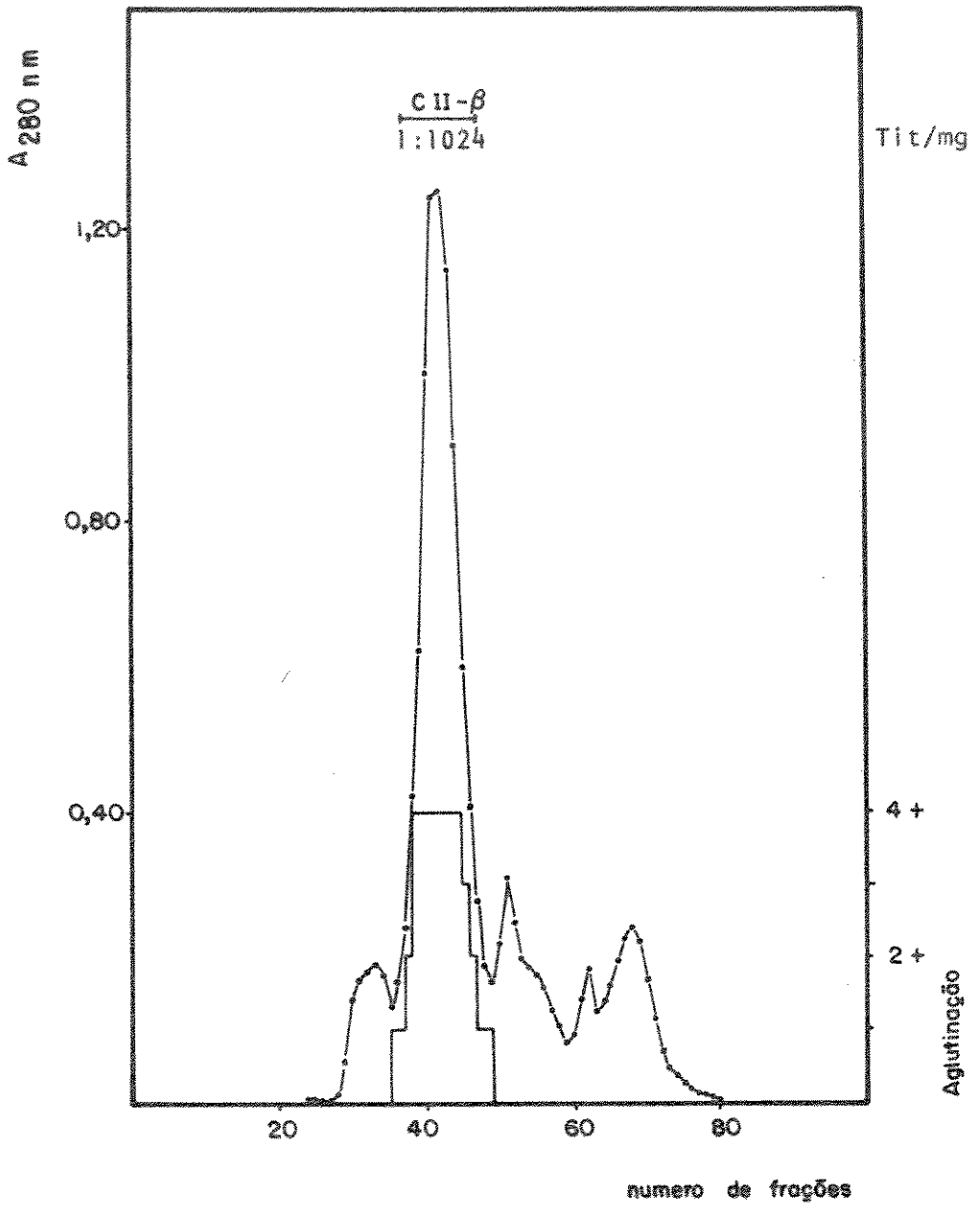

Fig. 7 - Separação por cromatografia em gel do componente CII-Af (40mg). Colunas (2,5 x 60 cm) de Sephadex G-200, equilibrada em tampão fosfato 0,01M, pH 7,0, contendo 0,15M de NaCl. Foram coletadas frações de 3mℓ, a uma velocidade de fluxo de 30mℓ/h. As frações foram lidas a 280nm, em cubetas de 1cm e ensaiadas para a atividade hemaglutinante (alíquotas de 0,1mℓ).

Quadro III - Purificação das hemaglutininas do feijão Rosinha G2 (*Phaseolus vulgaris*).

Material	Proteína		Atividade Hemaglutinante		nº de vezes de purificação
	mg/100g sementes	Recuperação (%)	Título/mg[a]	Atividade Total[b] (x 10^{-6})	
Sementes	23.400	100,0			
Extrato Salino[c]	15.000	64,0	128	1,9	1
CII-Af	2.100	9,0	512	1,1	4
CII-β	965	4,1	1024	1,0	8

[a]Maior diluição de 1mg de proteína capaz de aglutinar os eritrócitos bovinos tripsinizados.

[b]Título por 100g de sementes.

[c]Obtido de 4g de sementes em solução salina tamponado; dialisado contra a mesma solução, centrifugado a 70.000 x g, descartando-se o precipitado.

CII-Af: componente hemaglutinante obtido por cromatografia de afinidade, em dois experimentos a partir de um único extrato.

CII-β : componente hemaglutinante obtido por cromatografia em gel, em dois experimentos.

Estudo Eletroforético

O comportamento eletroforético do extrato salino (EXT) e frações albumina (ALB) e globulina (GLB), em gel de 8% de poliacrilamida a pH 8,4, está mostrado na Fig. 8. As mobilidades relativas dos diversos componentes separados estão mostrados na Fig. 12. O extrato total revelou a presença de 5 componentes designados *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, em ordem decrescente de suas mobilidades relativas. Estes componentes foram melhor resolvidos quando as proteínas foram previamente separadas quanto a solubilidade. Os de maior mobilidade, componentes *a*, *b*, *c*, concentram-se na fração ALB, embora o componente *b* esteja presente também na fração GLB. O componente *d*, que se apresentou como uma banda densa e difusa, separou-se no componente d_1, revelado apenas na fração GLB, e o no componente d_2, que aparece em ambas as frações. O componente *e*, que também se apresentou difuso, foi separado principalmente em 3 componentes: e_1, e_2, e_3. O componente e_1 revelou-se em ambas as frações, enquanto os demais aparecem apenas na fração GLB.

A Fig. 9 mostra os perfís das preparações aglutinantes, separadas por cromatografia em gel das frações inicialmente obtidas. Os perfís são semelhantes, mostrando predominância de componentes *d*,*e* em todas as preparações. A atividade hemaglutinante, quando eluída de géis obtidos paralelamente, parece apresentar um máximo na região dos componentes *e*-anódicos e *d*-catódicos.

O perfil do material purificado por cromatografia de afinidade (Fig. 10), revelou uma tendência de concentração do componente e_1, sendo notado que o componente *d* é composto de várias bandas de distâncias de migração próximas. A atividade hemaglutinante, pesquisada eluindo-se as proteínas dos géis, sugere que os componentes e_1, d_3, d_2 são os responsáveis pela atividade hemaglutinante, embora tenha-se notado que a atividade é mais intensa em direção ao catodo.

A Fig. 11 mostra o comportamento eletroforético da preparação obtida na última etapa da purificação. Notou-se uma forte associação entre os componentes e_1, d_2, d_3, que aparecem como uma única banda densa e larga.

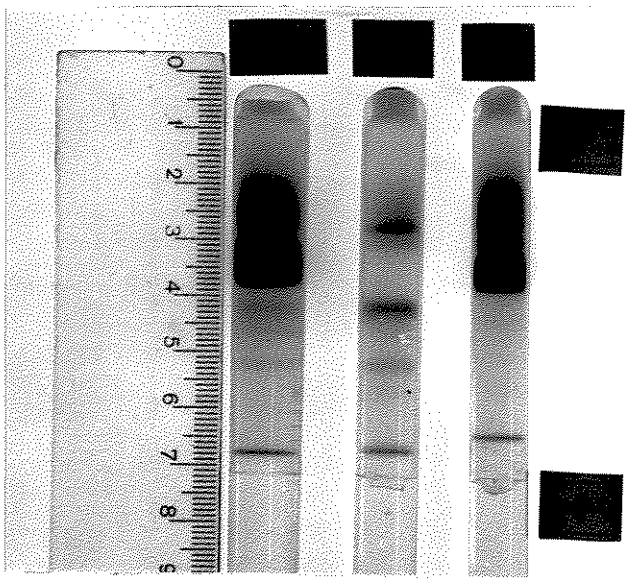

Fig. 8 - Eletroforese de disco. 1. EXT; 2. ALB; 3. GLB. Amostras de 200 µg/tubo. Tubos verticais (0,5 x 7,0 cm) contendo poliacrilamida a 8%. Tampão Tris-glicina 5mM, pH 8,4; corrente de 5mA/tubo. Géis corados em Amido Black.

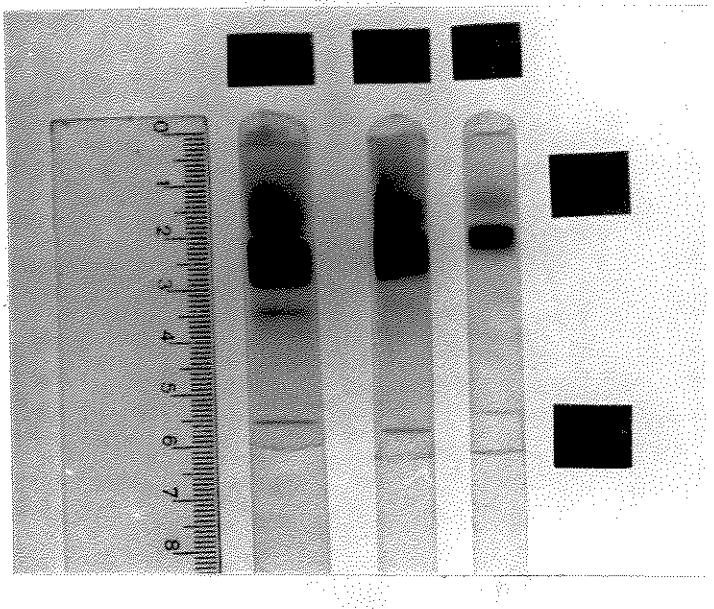

Fig. 9 - Eletroforese de disco. 1. HA-EXT; 2. HA-GLB; 3. HA-ALB Amostras de 200 µg/tubo. Tubos verticais (0,5 x 7,0 cm) contend poliacrilamida a 8%. Tampão Tris-glicina 5mM, pH 8,4; corrente d 5mA/tubo. Géis corados em Amido Black.

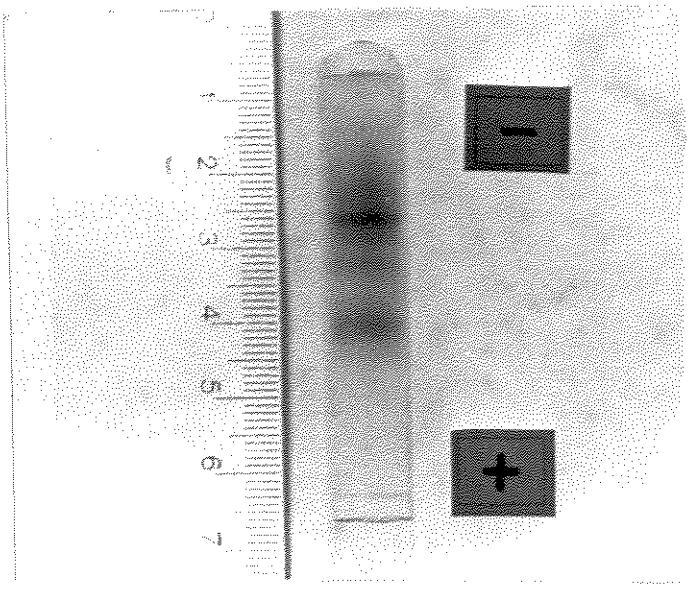

Fig. 10 - Eletroforese de disco. Componente CII-Af. Amostras de 200µg. Tubos verticais (0,5 x 7,0 cm) contendo poliacrilamida a 8%. Tampão Tris-glicina 5mM, pH 8,4; corrente de 5mA/tubo. Gel corado em Amido Black.

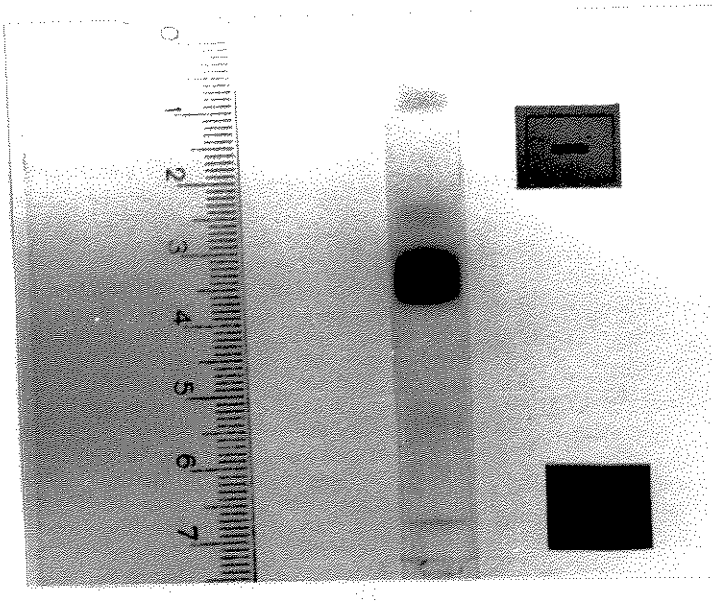

Fig. 11 - Eletroforese de disco. Componente CII-β. Amostras d
200µg. Tubos verticais (0,5 x 7,0 cm) contendo poliacrilamida a 8
Tampão Tris-glicina 5mM, pH 8,4; corrente de 5mA/tubo. Gel corad
em Amido Black.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

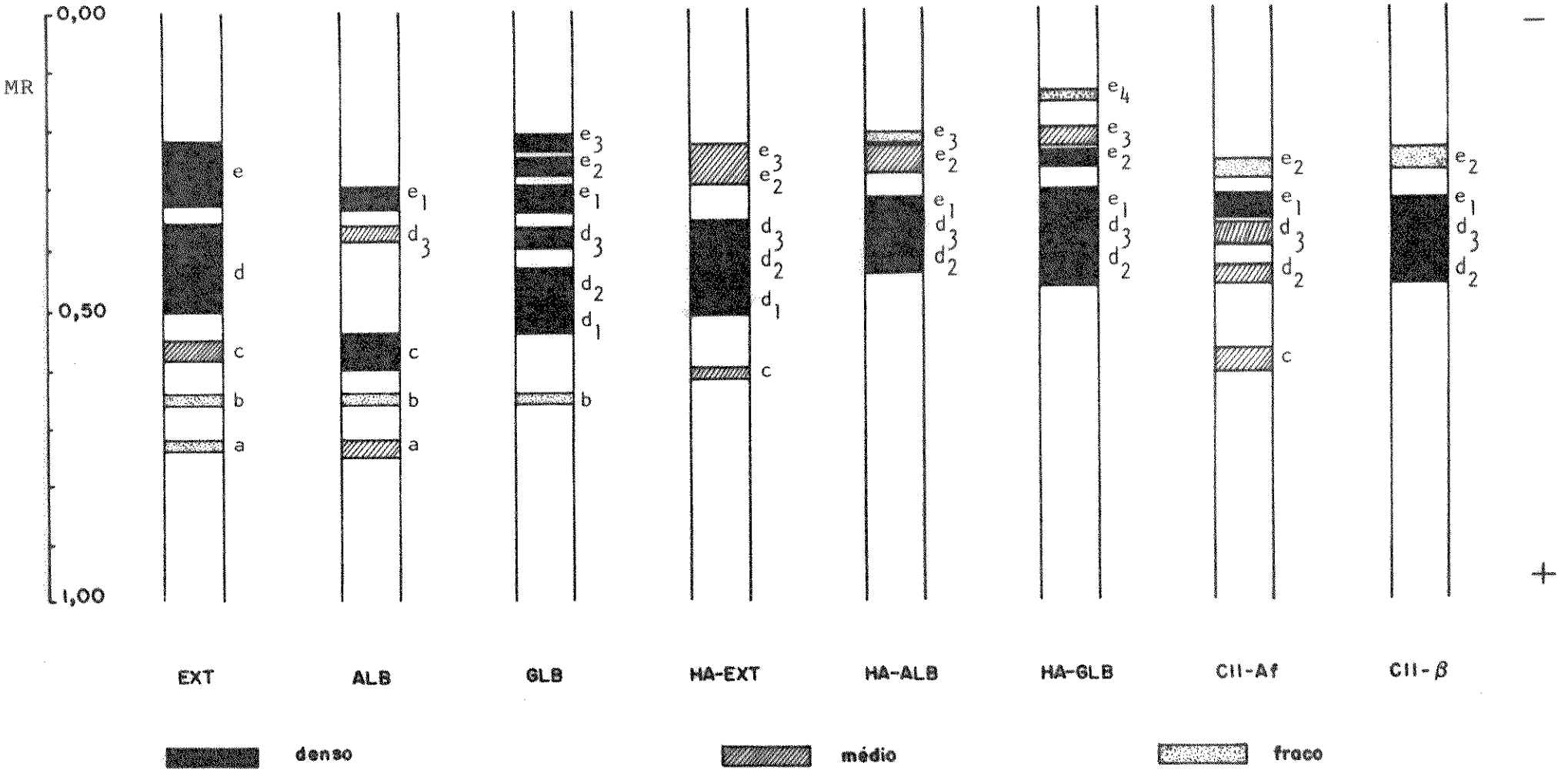

Fig. 12 - Eletroforese de disco: diagrama de interpretação. MR = mobilidade relativa em função de azul de bromofenol.

Focalização Isoelétrica em Gel de Poliacrilamida

A focalização isoelétrica da hemaglutinina purificada (Fig.13) mostra que a preparação não foi obtida em um estado completamente homogêneo. A Fig. 14 mostra o gráfico do pH x comprimento do gel. Foi traçada uma curva média, onde os valores de pH determinados para cada seção do gel, de 0,5cm, foram relacionandos com os pontos médios das mesmas seções. A posição das bandas de proteína no diagrama foi corrigida multiplicando-se a distância de migração ao catodo das bandas coradas, pelo fator $L_o/L = 0,85$, obtido da relação entre o comprimento inicial do gel e o seu comprimento após o procedimento de coloração. O principal componente separado, de ponto isoelétrico na faixa de pH de 5,5-5,7, foi o único que apresentou atividade hemaglutinante. Notou-se principalmente a contaminação da preparação com componentes de ponto isoelétrico na faixa de pH ácido.

Sedimentação em Gradiente Linear de Densidade

O coeficiente de sedimentação e peso molecular da hemaglutinina purificada foram determinados em gradiente de concentração de sacarose (5-20%), utilizando-se a desidrogenase lática como padrão interno. A Fig. 15 mostra os picos das atividades após a sedimentação. O coeficiente de sedimentação, calculado em função das distâncias dos picos ao menisco do gradiente, apresentou valores de $6,9 \pm 0,3S$ estando o peso molecular na faixa de 136.000 a 116.000.

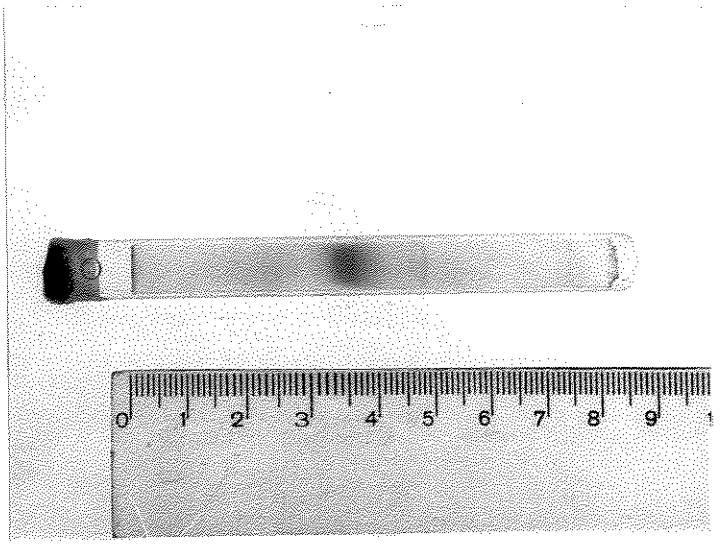

Fig. 13 - Eletrofocalização em gel (0,5 x 7,0 cm) de 7,3% de poliacrilamida, contendo 0,016% (p/v) de anfólitos (Ampholine LKB 8141). Foram aplicadas amostras de 100µg, sendo a focagem realizada a 2mA/tubo, pelo aumento gradativo da corrente até 350V. As bandas de proteína foram fixadas com ácido tricloracético e coradas por Coomassie Brillant Blue R250.

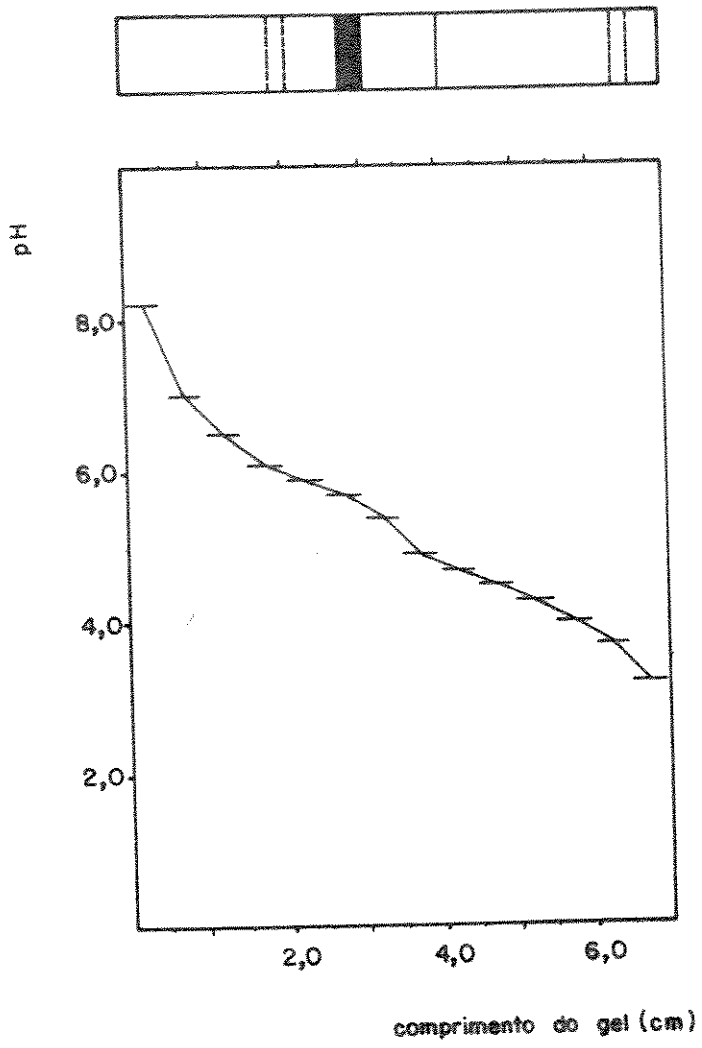

Fig. 14 - Focalização isoelétrica: curva pH x comprimento do gel. Os géis foram cortados em seções de 0,5cm e deixadas por uma noite em 1mℓ de água destilada. O pH foi determinado potenciometricamente e relacionado com o comprimento inicial do gel. A atividade hemaglutinante foi determinada nas soluções dialisadas por 48 horas, em salina tamponada.

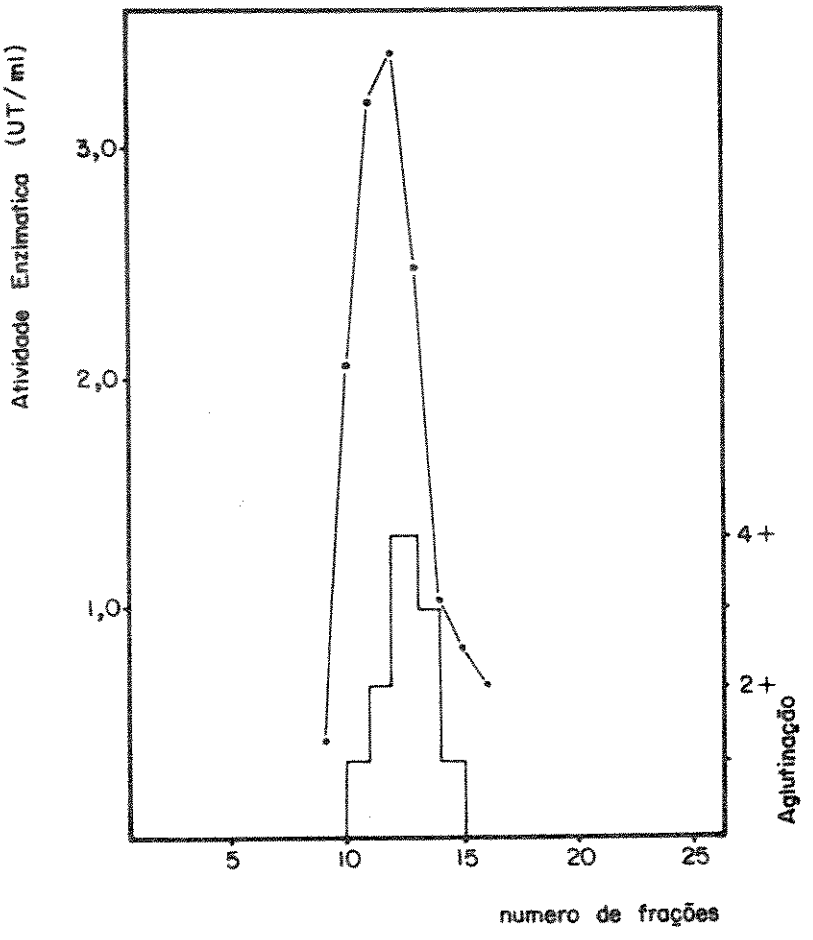

Fig. 15 - Sedimentação em gradiente linear de densidade. As amostras foram sedimentadas em gradientes (5-20%) de sacarose por centrifugação a 175.000 x g por 15 horas a 4°C em rotores SW 40 utilizando-se uma centrífuga Beckman Mod. L5.75. A desidrogenase lática ($s_{20,w}$ = 7,4S e M = 140.000) foi utilizada como padrão interno. Foram coletadas frações de 0,2mℓ. Atividade enzimática (·—·), aglutinação (—).

Determinação de Parâmetros Moleculares por Cromatografia em Gel

O peso Molecular da hemaglutinina purificada foi determinado por cromatografia em gel de Sephadex G-200, substituíndo-se seu volume de eluição V_e = 125 ± 2mℓ (n = 3) e V_o = 95,1 ± 0,3mℓ (n = 7) na Equação XI, previamente descrita, encontrando-se os valores de 136.000 ± 7.000.

Para a determinação do raio molecular de Stokes, a equação experimental foi obtida por análise de regressão (*104*), a partir dos padrões apresentados no quadro abaixo.

Quadro IV - Cromatografia em Sephadex G-200 de proteínas de raio molecular conhecido.

Padrões	a (Å)	K_d	$erfc^{-1}\ K_d$
Desidrogenase lática	42	0,14	1,05
Albumina de soro bovino	36	0,33	0,69
Pepsina	24	0,51	0,47
Inibidor de tripsina	11	0,84	0,14

A função de erro complementar inversa dos coeficientes de distribuição, $erfc^{-1}\ K_d$, foi obtida das equações III e IV. O raio de Stokes, a, do enibidor de tripsina de *P. lunatus* foi calculado pelo mesmo método empregado neste trabalho, utilizando-se os dados de Pusztai & Watt (*87*); os raios moleculares dos demais padrões foram obtidos a partir de suas constantes de difusão livre (*102*).

Assim, temos que:

$$a = 7,7 + 35,08\ erfc^{-1}\ K_d \qquad \text{(Eq. XII)}$$

Analogamente, determinou-se o coeficiente de distribuição da hemaglutinina, K_d = 0,16 ± 0,01 (n = 3) e sua função de erro complementar inversa, $erfc^{-1}\ K_d$ = 1,00 ± 0,03 e substituíndo-se na equação XII, determinamos seu raio molecular de Stokes:

$$a = 43 \pm 1 \text{Å}.$$

Conhecendo-se o raio de Stokes, calculamos a constante da difusão da hemaglutinina pela equação VII:

$$D_{20,w} = 5,0 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}.$$

O volume específico parcial da hemaglutinina foi determinado pela equação de Svedberg (Eq. VIII), mostrando-se equivalente a:

$$\bar{\nu} = 0,75 \text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}.$$

O coeficiente friccional $f/f_o = 1,3$, obtido pela equação IX, interpretado pelo diagrama de Oncley, dado por Springall (*105*), indica que a proteína possui um grau de hidratação máximo de 0,9g de água por grama de proteína e uma relação de eixos de simetria a/b=6, escolhendo-se o modelo de um elipsóide de revolução prolato ou a/b = 0,17 considerando-se o modelo de um elipsóide de revolução oblato.

O quadro V apresenta um resumo dos parâmetros físico-químicos determinados para a hemaglutinina purificada.

Quadro V - Propriedades físico-químicas da hemaglutinina do feijão Rosinha G2 (*Phaseolus vulgaris*).

Parâmetro	Valor
Peso molecular (M)	136.000
Coeficiente de sedimentação ($s_{20,w}$)	6,9S
Raio molecular de Stokes (a)	43 Å
Constante de difusão ($D_{20,w}$)	$5,0 \times 10^{-7}$ $cm^2.s^{-1}$
Volume específico parcial ($\bar{v}$)	0,75 mℓ.g^{-1}
Quociente friccional (f/f_o)	1,3
Ponto isoelétrico (pH)	5,5 - 5,7

Análise do Espectro de Absorção

Foram medidos espectros de absorção da hemaglutinina purificada em tampão fosfato 0,01M pH 7,0 contendo 0,15M de NaCl e solução de NaOH 0,1N, na faixa de comprimentos de onda de 250 a 320nm (Fig.16). O espectro medido em salina tamponada mostra picos de absorção em 278, 282 e 290nm. Foi calculada a absortividade específica a 280nm, a_{280} = 1,12 mℓ.mg^{-1}.cm^{-1}, que foi utilizada no cálculo da recuperação de proteína dos componentes obtidos nas separações cromatográficas. O espectro medido em solução de NaOH 0,1N foi utilizado para o cálculo da quantidade de triptofânio na amostra conforme o método de Bencze & Schmid (*9*).

Determinação de Carboidratos

Os açúcares neutros totais foram determinados pela reação com Fenol-H_2SO_4 (*30*), utilizando-se 50mg de fenol. A absortividade do produto da reação a 490nm, a_{490} = 11,3 mℓ.mg^{-1}.cm^{-1}, foi calculada em função de D-manose. O teor de açúcares neutros, expressos por 100g de proteína foi determinado como sendo igual a 8,3%.

O teor de amino-açúcares foi determinado em analisador de aminoácidos e expresso em função de glicosamina, como sendo de 2,12%.

Determinação de Aminoácidos

O quadro IV representa a composição de aminoácidos da hemaglutinina purificada. Os resultados foram expressos por 100g de proteína. Os valores apresentados não foram corrigidos para destruição ou incompleta liberação após a hidrólise ácida a 110°C por 24 horas. O teor de triptofânio foi determinado espectrofotometricamente, pela relação molar de Tirosina/Triptofânio, R = 0,48.

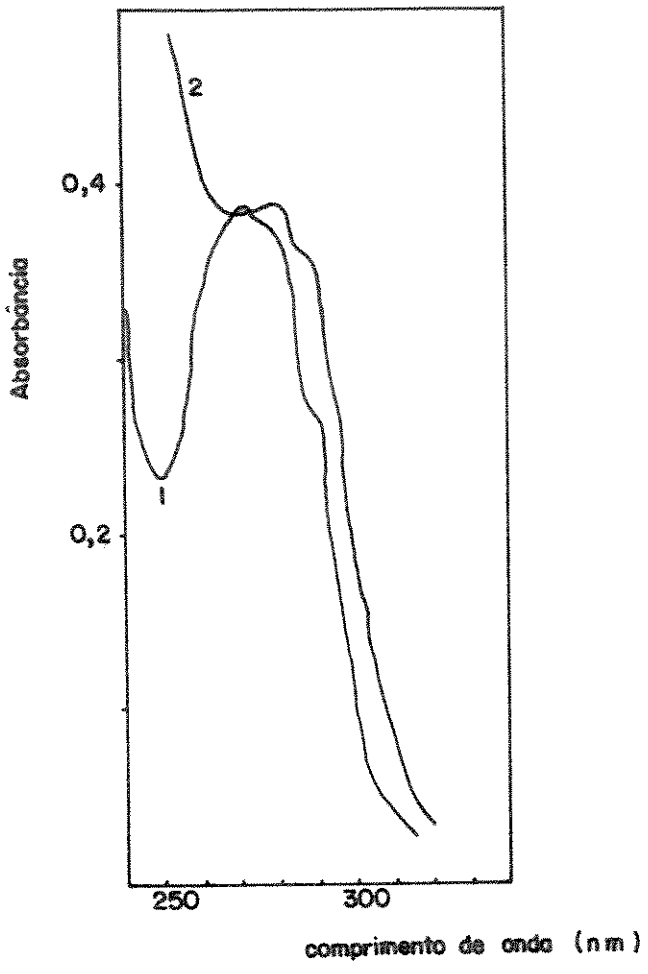

Fig. 16 - Espectro de absorção da hemaglutinina purificada. Amostras de 0,330mg em tampão fosfato 0,01M, pH 7,0, contendo 0,15M de NaCl (1) e NaOH 0,1N (2). Absortividade, a_{280} = 1,12 mℓ.mg^{-1}.cm^{-1}, $R_{Tyr/Trp}$ = 0,48.

Quadro VI – Composição em aminoácidos e carboidratos da hemaglutinina do feijão Rosinha G2.

Aminoácidos *	g/100g de proteína	mol/mol [a]
Lisina	3,63	33,8
Histidina	0,76	6,7
Amônia	2,35	
Arginina	2,45	19,1
Ácido Aspártico	11,64	118,9
Treonina	6,50	74,2
Serina	7,66	99,1
Ácido Glutâmico	6,29	58,1
Prolina	2,81	33,2
Glicina	3,44	62,3
Alanina	3,63	55,4
1/2 Cistina	traços	
Valina	3,63	42,0
Metionina	traços	
Isoleucina	2,63	27,3
Leucina	6,43	66,7
Tirosina	1,60	12,1
Fenilalanina	5,13	42,2
Triptofânio [b]	3,75	25,0
Carboidratos		
Glicosamina *	2,12	16,1
Manose [c]	8,30	62,7

[a] Mol de cada componente por 136.000g de proteína.

[b] Obtido pelo método de Bencze & Schmid (*9*).

[c] Obtido pelo método de Dubois *et al.* (*30*).

* Hidrolisado em HCl 6N, por 24 horas, a 110°C e determinado em analisador de aminoácidos.

DISCUSSÃO

O estudo inicial de extração e fracionamento das proteínas do feijão Rosinha G2 (*Phaseolus vulgaris*), foi feito procurando-se conhecer a distribuição da atividade hemaglutinante nas frações obtidas.

Existe na literatura, uma grande variedade de métodos de extração de proteínas de sementes, e além da complexidade das farinhas, as condições experimentais são críticas na determinação da extratibilidade (*21,29,31*). Comparando-se extrações em NaCl 0,5M, parece-nos que o número de vezes de extração pode ser apontado como um dos fatores determinantes na maior recuperação atingida em nossos estudos: 78,7% do nitrogênio total das sementes, frente aos resultados de Smith *et al.* (*100*): 76,2% de recuperação, com uma única extração do nitrogênio de "Kidney bean" (*P. vulgaris*). Por outro lado, Ishino & Ortega (*39*), utilizando uma extração em cinco etapas, recuperaram 88,4% do nitrogênio total das sementes do feijão "Negro Mecentral" (*P. vulgaris*).

As proteínas extraídas do feijão Rosinha G2 foram fracionadas por diferença de solubilidade após diálise. As proteínas precipitadas constituíram a fração globulina (GLB), enquanto aquelas que permaneceram solúveis foram consideradas albuminas (ALB). Uma vez que o feijão, como uma dicotiledônea, não contém prolaminas (*83*), o nitrogênio remanescente no resíduo insolúvel, 17,% do total, deve ser considerado nitrogênio não proteico, insolúvel, e glutelinas, seguindo-se a classificação quanto à solubilidade; uma vez que uma maior recuperação pode ser alcançada com extração em solução de NaOH, pH 9,0 (Sgarbieri, resultados não publicados). A porcentagem de recuperação de albuminas e globulinas em nossos estudos (Qua-

dro II), é semelhante à obtida por Pusztai *et al.* (*84*): 25,7% para albuminas e 47,0% para globulinas, ainda que estas frações tenham sido separadas por diferença de solubilidade a pH 5,0. Entretanto, os resultados de Osborne, em 1889, segundo Evans & Keer (*31*): 63,0% para globulinas e 8,5% para albuminas, sugerem que uma completa separação pode não ter sido alcançada.

Análises das frações por eletroforese de disco (Figs. 8 e 12) indicaram, o que poderíamos classificar de uma contaminação cruzada entre as frações. Alguns componentes estão presentes em ambas, particularmente o componente e_1, que aparece em quantidades significativas nas albuminas e globulinas. Do mesmo modo, a atividade hemaglutinante não foi recuperada em uma única fração. Existe, contudo, uma maior tendência em concentrar-se na fração solúvel, uma vez que as albuminas contêm aproximadamente 70% da atividade total extraída (Quadro II).

Quando as proteínas extraídas em NaCl 0,5M e as frações albumina e globulina foram sequencialmente fracionadas por cromatografia em gel (Figs. 3 a 5), vários componentes foram separados, não se obtendo contudo, uma clara resolução da atividade hemaglutinante. Observou-se que a atividade ocorre, aproximadamente, em uma mesma faixa de peso molecular no extrato bruto e frações albumina e globulina. Estes componentes aglutinantes quando analisados por eletroforese de disco, revelaram-se heterogêneos (Figs. 9 e 12). A atividade hemaglutinante, pesquisada em géis obtidos paralelamente, parece estar relacionada com a presença dos componentes *d*-catódicos e *e*-anódicos. A interpretação dos resultados foi dificultada pela acentuada perda da atividade hemaglutinante das preparações e pela nítida tendência de agregação entre os componentes constituintes de cada preparação. Assim, considerou-se os resultados insuficientes para a afirmação da presença de dois grupos de hemaglutininas que diferem em suas solubilidades em meios de baixa força iônica.

Pusztai & Watt (*88*) observaram que a atividade hemaglutinante de sementes de "White kidney bean" (*P. vulgaris*), é causada por uma família de glicoproteínas, denominadas isolectinas, que ocorrem principalmente na fração albumina, mas que são encontradas também na fração globulina. Apesar de apresentarem semelhanças em sua

constituição de aminoácidos e carboidratos, estas lectinas mostraram diferenças por critérios imuno-químicos (*86*). Por esta razão classificaram as hemaglutininas desta variedade em dois grupos, de acordo com sua solubilidade a pH 5,0.

Após o estudo de extração e fracionamento das proteínas do feijão Rosinha G2, procedeu-se à purificação das hemaglutininas por cromatografia de afinidade em ConA-Sepharose e cromatografia em gel de Sephadex G-200, seguindo-se basicamente o método proposto por Bessler & Goldstein (*10*). Procurou-se, entretanto, evitar fracionamentos prévios do extrato por métodos convencionais, como precipitações com sulfato de amônio, a fim de previnir possíveis agregações entre os componentes protéicos, como observaram outros autores (*25,88*). A utilização de cromatografia de afinidade no isolamento de hemaglutininas é recomendada justamente por ser realizada em condições brandas, o que causa pouco dano à atividade hemaglutinante, além de possibilitar o isolamento em poucas etapas, o que proporciona a obtenção de altos rendimentos (*24*). Como mostram os dados do Quadro III, a preparação aglutinante obtida nesta etapa da purificação, componente CII-Af, contém cerca de 60% da atividade hemaglutinante total, correspondendo a um grau de purificação de 4 vezes em relação ao extrato bruto.

As reações de hemaglutinação, realizadas em placas de acetato de celulose, mostraram-se úteis para a localização das hemaglutininas nas diferentes separações cromatográficas, pois permitem a apresentação de um quadro geral e comparativo da atividade nas frações coletadas. Contudo, como a titulação foi realizada por métodos semi-quantitativos, é difícil assegurar-se precisamente o grau de purificação e a recuperação da atividade, o que dificulta uma análise comparativa dos resultados. Ainda assim, pôde ser observado que nossos resultados são semelhantes aos reportados por Bessler & Goldstein (*10*), para o isolamento da hemaglutinina de "Wax bean" (*P. vulgaris*). Contudo, o grau de purificação atingido é bastante inferior aos obtidos por Felsted *et al.* (*32*) e Leavit *et al.* (*58*), respectivamente 25 e 18, no isolamento da hemaglutinina de "Red kidney bean" (*P. vulgaris*), por cromatografia de afinidade em tiroglobulina-Sepharose.

O perfil eletroforético do componente eluído por α-metil-D-manopi-

ranosídeo, componente CII-Af, mostra a existência de uma família de glicoproteínas de mobilidades relativas muito próximas. Pelo menos 5 componentes puderam ser revelados a pH 8,4 (Figs. 10 e 12). Os componentes e_1, d_3 e d_2 parecem constituir a hemaglutinina, contudo, uma acentuada diminuição na atividade hemaglutinante foi notada em direção ao anodo, sugerindo que o componente d_2 é o menos responsável pela atividade hemaglutinante.

Yachnin *et al.*(*116*) propuseram ser a hemaglutinina de "Red kidney bean", composta de 5 glicoproteínas tetraméricas, formadas de subunidades responsáveis pela eritroatividade (E) e atividade mitótica em linfócitos (L); de modo que seriam possíveis as estruturas E_4, E_3L_1, E_2L_2, E_1L_3, L_4. Felsted *et al.* (*33*) observaram que o perfil eletroforético, a pH 4,5, do componente isolado por cromatografia em tiroglobulina-Sepharose, mostrava claramente a existência de 5 bandas de glicoproteínas, sendo a eritroatividade relacionada com os componentes catódicos e a atividade mitótica com os componentes anódicos. Em nossos estudos, o perfil eletroforético, a pH 8,4, do componente isolado por cromatografia em ConA-Sepharose, mostrou que a região biologicamente ativa é composta de pelo menos 3 grupos de glicoproteínas. Embora não se tenha pesquisado a atividade mitótica, o comportamento eletroforético poderia ser interpretado de acordo com a estrutura proposta por Yachnin *et al.* (*116*). O componente e_1 poderia ser formado principalmente de estruturas E_4, o componente d_2 de estruturas L_4 e o componente d_3 de combinações de ambas subunidades. Contudo, a existência de variedades de feijão não mitogênicas, já foi confirmada (*42,88*). Assim, a presença de diferentes subunidades contendo diferentes atividades biológicas e, portanto, o número de isolectinas possíveis parece ser mais complexo. Pusztai e seu grupo (*86,88*) afirmam que mais de cinco isolectinas podem estar presentes, mesmo em variedades não mitogênicas de *Phaseolus vulgaris*. Possivelmente as diferenças no número de isolectinas encontradas em diferentes variedades, possam ser atribuídas às reações de associação e dissociação entre as subunidades, contudo, o número exato de componentes e o significado dos fatores estruturais responsáveis por sua existência não estão completamente esclarecidos.

Quando a preparação hemaglutinante, obtida por cromatografia de

afinidade, componente CII-Af, foi sequencialmente purificada por cromatografia em gel (Fig. 7), a atividade foi eluída em um único componente, denominado CII-β. Foi recuperado nesta preparação cerca de 50% da atividade hemaglutinante total, obtendo-se um grau de purificação correspondente a 8 (Quadro III). Embora este componente tenha apresentado um perfil de eluição relativamente simétrico e um comportamento eletroforético bastante semelhante a outras hemaglutininas purificadas por vários autores (*10,94,109*), o grau de purificação atingido parece um pouco baixo. O perfil eletroforético desta preparação (Fig. 11), sugere a ocorrência de reações de associação entre os componentes e_1, d_3 e d_2. Estas reações poderiam ser responsabilizadas, direta e indiretamente, pelo grau de purificação relativamente baixo, atingido em nossas preparações. Em primeiro lugar, isto impediria o isolamento dos componentes constituintes e em segundo lugar acarretaria uma diminuição na atividade hemaglutinante específica, possivelmente bloqueando a atividade da lectina mais reativa.

Dahlgren & Porath (*25*) também responsabilizaram as reações de associação pela perda da atividade hemaglutinante observada no isolamento da lectina de "Red kidney bean". Segundo estes autores, embora a afinidade das moléculas de hemaglutininas pelas paredes celulares esteja governada por interações específicas do sítio ligante com os glicopeptídeos receptores, outros tipos de forças, de natureza eletrostática, tomam parte na reação de hemaglutinação. Estas forças que favoreceriam interações entre as lectinas participariam no início do processo de aglutinação, propiciando a afinidade das moléculas de hemaglutinina pelas paredes celulares, negativamente carregadas no pH fisiológico.

Forças da mesma natureza explicam a afinidade das células sanguíneas tratadas com hemaglutinina pelas paredes de vidro dos tubos de ensaio, como observou Forsdyke (*35*). Em nossos estudos notamos que após tratamento das hemácias com soluções de hemaglutinina, as células aderiam às superfícies de acetato de celulose, das placas de hemaglutinação. Esta afinidade era tanto menor quanto mais diluída era a solução de hemaglutinina e mostrou-se reversível, uma vez que as células se soltavam facilmente das paredes com leves agitações mecânicas, em forma circular, das placas de aglutinação.

Se deixadas em repouso, após certo tempo, notava-se que as células novamente aderiam às paredes da placa. Estas evidências parecem confirmar a natureza polar das interações, se bem que McKenzie *et al.* (*70*) tenham sugerido que grupos de natureza hidrofóbica desempenham também importante papel na formação de agregados entre moléculas de Concanavalina A.

Foram estudadas algumas propriedades físico-químicas do componente hemaglutinante, CII-β. Por eletrofocalização em gel de poliacrilamida, a atividade foi detectada no principal componente, de ponto isoelétrico na faixa de pH de 5,5 - 5,7; evidenciando-se, principalmente, a presença de outro componente de ponto isoelétrico em pH 4,7. Embora este não tenha apresentado atividade, o seu ponto isoelétrico é semelhante a uma das isolectinas de fração albumina de "White kidney bean", caracterizada por Pusztai *et al.* (*86,88*).

Foram estudados diversos parâmetros moleculares da hemaglutinina, por ultracentrifugação em gradiente de densidade e cromatografia em gel. O seu coeficiente de sedimentação, $s_{20,w} = 6,9 \pm 0,3$ S foi determinado, indiretamente, em função da desidrogenase lática. Considerou-se que a relação das distâncias de migração das duas proteínas no campo gravitacional é proporcional à relação de seus coeficientes de sedimentação (Eq. I) (*68*). Isto baseia-se na suposição de que as distâncias de sedimentação das proteínas são lineares em função do tempo, o que parece verdadeiro para proteínas cujos volumes específicos parciais são inferiores a 0,80 $m\ell g^{-1}$ (*106*). O padrão utilizado tem um volume específico parcial correspondente a 0,75 $m\ell g^{-1}$ e apresenta características estruturais semelhantes a outras hemaglutininas de feijão (*32*).

A cromatografia em gel é, reconhecidamente, de grande valor em procedimentos preparativos, contudo, poucos autores que caracterizaram hemaglutininas, utilizaram-se de seu potencial analítico. Já foram propostos diversos modelos para descrever o mecanismo de separação e relacionar a posição de eluição dos componentes com suas propriedades moleculares (*1,34,80*). Ackers, em 1967 (*2*), sem considerar a estrutura do gel, assume apenas que microregiões do volume não excluído estão distribuídas aleatoriamente, com respeito aos tamanhos moleculares que podem acomodar. Assim, são obtidas relações lineares entre o raio molecular dos componentes e a função de

erro complementar inversa do coeficiente de distribuição na coluna. Entretanto, este coeficiente é definido considerando-se apenas o líquido de embebição do gel como fase estacionária, não levando em conta, portanto, interações dos componentes com a matriz do gel.

Como a hemaglutinina tem a propriedade de interagir com carboidratos, pode-se esperar que seja retardada em sua velocidade de eluição devido a interações com o Sephadex. Dahlgren & Porath (*25*) e Weber (*112*), estabelecendo uma comparação da eluição da hemaglutinina de "Red kidney bean" (*P. vulgaris*) em Sephadex e Biogel, mostraram que não há adsorção da lectina pelo Sephadex, uma vez que o mesmo volume de eluição foi registrado em ambas as cromatografias. Estes resultados foram considerados válidos também para a hemaglutinina do feijão Rosinha G2, para justificar-se a utilização do método de Ackers (*2*) na determinação de seu raio molecular de Stokes. O valor encontrado, a = 43Å, foi utilizado para o cálculo da constante de difusão da hemaglutinina purificada (Eq.VII). Foram feitas algumas aproximações como, considerar a viscosidade da solução como sendo igual a da água e a temperatura do sistema, que não foi rigidamente controlada, como sendo de 20°C. O valor encontrado é o mesmo se utilizarmos o método empírico de Andrews (*4*), que considera linear a relação entre o inverso das constantes de difusão e os volumes de eluição dos componentes. Este parâmetro é, na verdade, a difusão limitada pelos poros dos géis (*90*), mas considerou-se como sendo igual à difusão livre, definida como a quantidade de matéria que difunde através de $1cm^2$, em um segundo, quando o gradiente de concentração é unitário (*52*).

Whitaker, em 1963 (*114*) e Andrews, em 1964 (*4*), obtiveram por métodos empíricos, boas correlações lineares entre a posição de eluição e o logaritmo de peso molecular de várias proteínas globulares de baixo quociente friccional. Este método foi empregado na determinação do peso molecular da hemaglutinina obtida, e o valor determinado, M = 136.000 $\pm$ 7.000, parece compatível com a faixa de peso molecular de 116.000 - 136.000, encontrado por ultracentrifugação em gradiente de densidade.

O volume parcial específico da hemaglutinina, $\bar{v}$ = 0,75 $m\ell.g^{-1}$, determinado pela equação de Svedberg (Eq.VIII) é bem semelhante ao valor médio de 0,73$m\ell.g^{-1}$ de proteínas globulares, apontadas por Andrews,

como padrões típicos. Contudo, como a hemaglutinina é uma glicoproteína e, devido ao maior grau de hidratação da porção de carboidratos, em relação às cadeias polipeptídicas, pode-se supor uma estrutura mais expandida para a molécula em solução, e assim a hemaglutinina poderia não seguir um comportamento típico por cromatografia em gel.

A previsão da forma da proteína em solução é um problema extremamente complexo. Envolve a utilização de cálculos e modelos aproximados e nem sempre os resultados são suficientemente sifinificativos. Considerando o peso molecular da hemaglutinina, M = 136.000, estimou-se a forma da proteína em solução, pela determinação de seu quociente friccional, f/f_o = 1,3 (Eq.IX) (*67*). Este valor analisado pelo diagrama de Oncley, dado por Springall (*105*) indica que a proteína pode assumir qualquer combinação de hidratação e assimetria dentro dos seguintes limites: 0,9g de água por grama de proteína e uma razão axial, a/b = 6, se o modelo de um elipsóide de revolução prolato for escolhido ou a/b = 0,17 se considerarmos um elipsóide de revolução oblato.

Diferentes interpretações são encontradas na literatura a respeito do comportamento hidrodinâmico de hemaglutininas. Rigas *et al.* (*93*) determinaram f/f_o = 1,225 para a lectina de "Red kidney bean". Assumindo a água de hidratação da hemaglutinina como igual à da albumina de soro bovino, 0,37g de água por grama de proteína (*56*), afirmaram que o comportamento hidrodinâmico era compatível com um elipsóide de revolução oblato de razão axial, a/b = 0,33 ou prolato de a/b = 3. Por outro lado, Pusztai & Stewart (*86*) escolhendo o modelo de um elipsóide prolato de a/b = 10, encontraram um valor para o quociente friccional que se afasta bem mais da unidade, f/f_o=1,56. Este valor, se interpretado pelo diagrama dado por Springall (*105*) equivale a um limite de hidratação de aproximadamente 2,0g de água por grama de proteína.

Como citam estes autores, o elevado grau de hidratação da molécula poderia ser de enorme significado fisiológico na germinação e maturação da semente, particularmente devido ao potencial de associação das hemaglutininas às membranas de organelas intracelulares, como o mitocôndrio e os corpos protéicos. Contudo, acreditamos que se levarmos em consideração a grande tendência para a formação de

agregados entre as múltiplas formas destas glicoproteínas, parece teoricamente mais viável que não existam muitos "espaços internos" acessíveis ao solvente e, portanto, embora tratando-se de glicoproteínas, poderia esperar-se que seu grau de hidratação não fosse tão elevado.

A análise do espectro de absorção na região do ultra-violeta, da hemaglutinina obtida, indica um comportamento típico de material protéico, sendo o perfil observado semelhante ao apresentado por outros autores (*89,112*). A absortividade a 280nm foi expressa em termos da absortividade específica, $a_{280} = m\ell.g^{-1}.cm^{-1}$, ao invés do antigo e confuso parâmetro, coeficiente de extinção, $E^{1\%,1cm}_{280nm}$.

Análises químicas revelaram que a hemaglutinina do feijão Rosinha G2 é uma glicoproteína. O teor de açúcares neutros foi expresso em função de manose e os aminoaçúcares como glicosamina, que segundo a maioria dos autores são os principais, senão os únicos, açúcares constituintes da hemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (*71,89*). A constituição em aminoácidos é de certa forma semelhante a outras hemaglutininas (*88,109*). Não contém aminoácidos sulfurados, que a despeito da marcada perda destes aminoácidos durante a hidrólise ácida, está de acordo com os resultados de outros autores, que verificaram suas ausências mesmo com prévia oxidação com ácido perfórmico (*58*). Ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutâmico, leucina e fenilalanina aparecem como os principais aminoácidos constituintes da molécula. O teor de triptofânio, contudo, mostrou valores mais elevados que os comumente reportados na literatura.

Comparando-se as propriedades químicas e físico-químicas da hemaglutinina do feijão Rosinha G2 (Quadro IV) e outras hemaglutininas de *Phaseolus vulgaris* (Quadro I) pôde-se verificar que são semelhantes em muitos aspectos fundamentais.

CONCLUSÕES

Diálise por 36 horas, contra água destilada, fraciona, por diferença de solubilidade, as proteínas do feijão Rosinha G2, em dois componentes hemaglutinantes. A atividade hemaglutinante específica da fração solúvel (ALB) é quatro vezes maior que a da fração insolúvel (GLB). Eletroforeticamente, estas frações não são completamente distintas, contudo, a fração GLB é mais rica em componentes hemaglutinantes anódicos.

Apenas um componente hemaglutinante é obtido do extrato salino e de cada uma das frações ALB e GLB, por cromatografia em gel de Sephadex G-200, em tampão fosfato 0,01M, pH 7,0, contendo 0,15M de NaCl.

Obtém-se do extrato salino, por cromatografia de afinidade em ConA-Sepharose, apenas um componente hemaglutinante. Esta preparação separa-se, por eletroforese de disco, em géis de 8% de poliacrilamida, a pH 8,4, em pelo menos cinco componentes, três deles contendo atividade hemaglutinante, que decresce em direção ao anodo.

Quando o componente CII-Af é sequencialmente purificado por cromatografia em gel de Sephadex G-200, apenas um componente hemaglutinante, CII-β, é obtido. A análise eletroforética desta preparação indica a ocorrência de reações de associação entre seus constituintes.

O tratamento das hemácias bovinas, tripsinizadas, com solução de hemaglutinina, provoca aderência das células à superfícies de acetato de celulose. A partir da estrutura do acetato de celulose pode-se supor que, sua interação com as células, seja devido a grupos de natureza polar.

A eletrofocalização em gel de poliacrilamida revela que o ponto isoelétrico da hemaglutinina está em uma faixa de pH de 5,5 - 5,7, contudo, mostra que a preparação não foi obtida em um estado completamente homogêneo.

A hemaglutinina purificada apresentou um peso molecular de 136.000 $\pm$ 7.000, um raio molecular de Stokes de 43 $\pm$ 1 Å e um coeficiente de sedimentação de 6,9 $\pm$ 0,3 S, os primeiros parâmetros determinados por cromatografia em gel e o último por ultracentrifugação em gradiente linear de densidade.

Julgando-se por seu volume parcial específico, $\bar{\nu}$ = 0,75 mℓ.g^{-1} e por seu coeficiente friccional, f/f_o = 1,3, a hemaglutinina é uma proteína globular e não é simétrica em solução.

A hemaglutinina purificada contém, apenas, traços de aminoácidos sulfurados, mas é rica principalmente em ácido aspártico e serina. É uma glicoproteína, contendo 8,30% de açúcares neutros e 2,12% de glicosamina.

BIBLIOGRAFIA

1. ACKERS, G.K. Molecular Exclusion and Restricted Diffusion Process in Molecular-Sieve Chromatography. *Biochemistry, 3*:723, 1964.

2. ACKERS, G.K. A New Calibration Procedure for Gel Filtration Columns. *J. Biol. Chem., 242*:3237, 1967.

3. ALLEN, N.K. & BRILLIANTINE, L. A Survey of Hemagglutinins in Various Seeds. *J. Immun., 102*:1295, 1969.

4. ANDREWS, P. The Gel-Filtration Behaviour of Proteins Related to their Molecular Weights over a Wide Range. *Biochem. J., 96*:395, 1965.

5. ANSON, M.L. The Extinction of Pepsin, Trypsin, Papain and Cathepsin with Hemoglobin. *J. Gen. Physiol., 22*:79, 1938.

6. A.O.A.C. - Association of Official Analytical Chemists. "Official Methods of Analysis". Washington, D.C., 1955.

7. ASBERG, K., HOLWER, H. & PORATH, J. A Nonspecific Phytohemagglutinin found in *Vicia craca*. *Biochim. Biophys. Acta, 160*:116, 1968.

8. AUB, J.C., TIESLAN, C. & LANKESTER, A. Reactions of Normal and Tumor Cell Surfaces to Enzymes, I. Whead-Germ Lipase and Associated Mucopolysaccharides. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 50*: 613, 1963.

9. BENCZE, W.L. & SCHMID, K. Determination of Tyrosine and Tryptophan in Proteins. *Anal. Chem., 29*:1193, 1957.

10. BESSLER, W. & GOLDSTEIN, I.J. Phytohemagglutinin Purification: A General Method Involving Affinity and Gel Chroma-

tography. *FEBS LETTERS, 34*:58, 1973.

11. BIRD, G.W.G. Haemagglutinins in Seeds. *Brit. Med. Bull., 15*:165, 1959.

12. BOHLOOL, B.B. & SCHMIDT, E.L. Lectins: A Possible Basis for Specificity in the *Rhizobium*-Legume Root Nodule Symbiosis. *Science, 185*:269, 1974.

13. BORBERG, H., HIRSCHHORN, J.W.R., MIESCHER, B.G.P. & SILBER, R. Phytohemagglutinin: Inhibition of the Agglutinanting Activity by N-Acetil-D-Galactosamine. *Science, 154*:1019 , 1966.

14. BOYD, W.C. The Lectins: Their Present Status. *Vox Sang., 8*:1, 1963.

15. BOYD, W.C. & REGUERA, R.M. Hemagglutinanting Substances for Human Cells in Various Plants. *J. Immunol., 62*:333, 1949.

16. BOYD, W.C. & SHAPLEIGH, E. Separation of Individuals of Any Blood Group into Secretors by Use of a Plant Agglutinin (Lectin). *Blood, 9*:1195, 1954.

17. BOYD, W.C. & SHAPLEIGH, E. Specific Precipitanting Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science, 119*:419 , 1954.

18. BOYD, W., SHAPLEIGH, E., McMASTER, M. Immunochemical Behavior of a Plant Agglutinin (Lectin). *Arch. Biochem. Biophys., 55*:226, 1955.

19. BURGER, M.M. A Difference in the Architecture of the Surface Membrane of Normal and Virally Transformed Cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 62*:994, 1969.

20. BURGER, M.M. & GOLDBERG, A.R. Identification of a Tumor-Specific Determinant on Neoplastic Cell Surfaces. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 57*:359, 1967.

21. CAGAMPANG, G.B., CRUZ, L.J., ESPIRITU, S.G., SANTIAGO, R.G. & JULIANO, B.O. Studies on the Extraction and Composition of Rice Proteins. *Cereal Chemistry, 43*:145, 1966.

22. CHESSIN, L.N., BÖRJESON, J., WELSH, P.D., DOUGLAS, S.D. & COOPER, H.L. Studies on Human Peripheral Blood Lympho-

cytes *in vitro*. *J. Exp. Med.*, *124*:873, 1966.

23. CONSTANTINIDES, S.M., SGARBIERI, V.C. & GALEAZZI, M.A.M. Experimentos em Bioquímica e Nutrição: Manual de Laboratório, (a ser editado).

24. CUATRECASAS, P. Protein Purification by Affinity Chromatography. *J. Biol. Chem.*, *245*:3059, 1970.

25. DAHLGREN, K. & PORATH, J. On the Purification of Phytohemagglutinins from *Phaseolus vulgaris* Seeds. *Arch. Biochem. Biophys.*, *137*:306, 1970.

26. DAVIS, B.J. Disc Electrophoresis - II. Method and Application to Human Serun Proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, *121*: 321, 1964.

27. DAZZO, F. & BRILL, W. Phase Contrast Interference Micrography of Clover Root Hair Attached with *R.trifolli* Cells. In Looking at Lectins: Do they Function in Recognition Processes? J.L. Marx *Science*, *196*:1429, 1977.

28. DERSE, P.H. Evaluation of Protein Quality. II. Methods. *Journal of the A.O.A.C.*, *41*:152, 1958.

29. DJANG, S.T., LILLEVIK, H.A. & BALL, C.D. Factors Affecting Solubilization on the Nitrogenous Constituents of the Mung Bean, *Phaseolus aureas*. *Cereal Chemistry*, *30*:230 , 1953.

30. DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.*, *28*:350, 1956.

31. EVANS, R.J. & KERR, M.H. Extraction and Precipitation of Nitrogenous Constituents of Dry Navy Beans *P. vulgaris*. *J. Agr. Food Chem.*, *11*: 26, 1963.

32. FELSTED, R.L., EGORIN, M.J., LEAVITT, R.D. & BACHUR, N.R. Recombinations of Subunits of *Phaseolus vulgaris* Isolectins. *J. Biol. Chem.*, *252*:2967, 1977.

33. FELSTED, R.L., LEAVITT, R.D. & BACHUR, N.R. Purification of the Phytohemagglutinin Family of Proteins from Red Kidney Beans (*Phaseolus vulgaris*) by Affinity Chromatography.

Biochim. Biophys. Acta, 405:72, 1975.

34. FISHER, L. An Introduction to Gel Chromatography. In "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology". T.S. Work, ed. Amsterdam. North-Holland Publishing Company. 1971. p. 338-351.

35. FORSDYKE, D.R. Incorporation of $|5^{3}H|$Uridine and Attachment of Cells to Glass during Activation of Lymphocytes Induced by Phytohaemagglutinin. *Biochem. J., 108*:297 , 1968.

36. GALEAZZI, M.A.M. Extração, Purificação e Propriedades da Polifenoloxidase da Banana Nanica (*Musa Cavendishii, L.*). Campinas, 1978. Tese de Doutoramento. Fac. Eng. Alimentos e Agrícola. Universidade Estadual de Campinas.

37. HOBBINS, J.H. Tissue Culture Studies of Human Lynphocyte. *Science, 146*:1648, 1964.

38. HONAVAR, P.M., SHIH, C.V., LIENER, I.E. Inhibition of the Growth of Rats by Purified Hemagglutinin Fractions Isoted from *Phaseolus vulgaris*. *J. Nutrition, 77*:109, 1962.

39. ISHINO, K. & ORTEGA, M.L.D. Fractionation and Characterization of Major Reserve Proteins from Seed of *P. vulgaris*. *J. Agric. Food Chem., 23*:531, 1975.

40. JAFFÉ, W.G. Blutagglutinierende und Toxische Eiweissfraktionen aus Bohnen. *Experientia, 15*:76, 1962.

41. JAFFÉ, W.G. Hemagglutinins. In: "Toxic Constituents of Plant Foodstoffs. I.E. Liener, ed. New York. Academic Press. 1969. p. 69.

42. JAFFÉ, W.G. & BRÜCHER, O. Toxicidad y Especificidad de diferentes Fitohemaglutininas de Frijoles. *Arch. Latinoamer. Nutr., 22*:267, 1972.

43. JAFFÉ, W.G., BRÜCHER, O. & PALOZZO, A. Deteccion of Four Types of Specific Phytohemagglutinins in Different Lines of Beans (*Phaseolus vulgaris*). *Z. Immun.-Forsch. Bd., 142*:439, 1972.

44. JAFFÉ, W.G. & CAMEJO, G. La Accion de una Proteina Tóxica

Aislada de Caraotas Negras (*Phaseolus vulgaris*) sobre la Absorcion Intestinal en Ratas. *Acta Cient. Venezolana*, *12*:59, 1961.

45. JAFFÉ, W.G. & GAEDE, K. Purification of a Toxic Phytohemagglutinin from Black Beans (*Phaseolus vulgaris*). *Nature*, *183*:1329, 1959.

46. JAFFÉ, W.G. & HANNING, K. Fractionation of Proteins from Kidney Beans (*Phaseolus vulgaris*). *Arch. Biochem. Biophys.*, *109*:80, 1965.

47. JAFFÉ, W.G., LEVY, A. & GONZÁLEZ, D.I. Isolation and Partial Characterization of Bean Phytohemagglutinins. *Phytochemistry*, *13*:2685, 1974.

48. JONES, G., MOORE, S. & STEIN, H. Properties of Chromatographycally Purified Trypsin Inhibitors from Lima Beans, (*Phaseolus lunatus*). *Biochemistry*, *2*:66, 1963.

49. KABAT, E.A. & MAYER, M. Experimental Immunochemistry. Trad. G. Leyton R. Mexico. La Prensa Medica Mexicana. 1968. p. 89-122.

50. KAKADE, M.L., SIMONS, N. & LIENER, I.E. An Evaluation of Natural vs. Synthetic Substrates for Measuring the Antitryptic Activity of Soybean Samples. *Cereal Chemistry*, *46*:518, 1969.

51. KHALAP, S., THOMPSON, T.E. & GOLD, E.R. Hemagglutination and Haemagglutination-Inhibition Reactions of Extracts from Snails and Sponges. *Vox Sang.*, *18*:501, 1970.

52. KIREEV, V. Physical Chemistry. Transl. by G. Peck & F. Leib. Moscow. Mir Publishers. 1972. p.459.

53. KORNBERG, A. Estimation of Lactate Dehydrogenase in the Presence of Excess of Pyruvate. In: "Methods in Enzymology", Vol. 1. S.P. Colowick & N.O. Kaplan, ed. New York. 1955. p. 441.

54. KORNFELD, R. & KORNFELD, S. The Structure of a Phytohemagglutinin Receptor Site from Human Erythrocytes *J. Biol. Chem.*, *245*:2536, 1970.

55. KORNFELD, R., GREGORY, W.T. & KORNFELD, S.A. Red Kidney Bean (*Phaselous vulgaris*) Phytohemagglutinin. *Methods Enzymol.*, *28*:360, 1972.

56. KUNTZ, I.D.J., BRASSFIELD, T.S., LAW, G.D. & PURCEL, G.V. Hydration of Macromolecules. *Science*, *163*:1329, 1969.

57. LANDSTEINER, K. & RAUBITSCHEK, H. Agglutination of Blood from Different Animal by Legume Extracts. In: "Toxic Constituents of Plant Foodstoffs" I.E. Liener, ed. New York. Academic Press. 1969. p. 71.

58. LEAVITT, R.D., FELSTED, R.L. & BACHUR, N.R. Biological and Biochemical Properties of *Phaseolus vulgaris* Isolectins. *J. Biol. Chem.*, *252*:2961, 1977.

59. LIENER, I.E. The Intraperitoneal Toxicity of Crude Concentrates of the Soybean Trypsin Inhibition. *J. Biol. Chem.* *193*:183, 1951.

60. LIENER, I.E. The Photometric Determination of the Hemagglutinating Activity of Soyin and Crude Soybean Extracts. *Arch. Biochem. Biophs.*, *54*:223, 1955.

61. LIENER, I.E. Phytohemagglutinins: Their Nutricional Significance. *J. Agr. Food Chem.*, *22*:1, 1974.

62. LIENER, I.E. Significance of Humans of Biologically Active Factors in Soybeans and Other Food Legumes. *J. Am. Oil Chemists*, *56*:121, 1979.

63. LINDEMANN, W.C., SCHMIDT, E.L. & HAM, G.E. Evidence for Double Infection within Soybean Nodules. *Soil Science*, *118*:274, 1974.

64. LIS, H., FRIDMAN, C., SHARON, N. & KATCHALSKY, E. Multiple Hemagglutinins in Soybean. *Arch. Biochem. Biophys.*, *117*: 301, 1966.

65. LIS, H. & SHARON, N. Soy Bean (*Glycine max*) Agglutinin. *Methods Enzymol.*, *28*:360, 1972.

66. MAHLER, H.R. & CORDES, E.H. Biological Chemistry. New York. Harper & Row, Publisher. 1966. p. 43.

67. MOORE, W.J. Physical Chemistry. London. Prentice-Hall,

Inc., Englewood Cliffs. 1964. p. 757-781.

68. MARTIN, R.G. & AMES, B.N. A Method for Determining the Sedimentation Behavior of Enzymes: Application to Proteins Mixtures. *J. Biol. Chem.*, *236*:1372, 1961.

69. MATSUMOTO, I. & OSAWA, T. The Specific Purification of Various Carbohydrate-Binding Hemagglutinins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *46*:1810, 1972.

70. McKENZIE, G.H., SAWYER, W.H. & NICHOL, L.W. The Molecular Weight and Stability of Concanavalin A. *Biochim. Biophys. Acta*, *263*:283, 1972.

71. MILLER, J.B., HSU, R., HEINRIKSON, R. & YACHNIN, S. Extensive Homology betwen the Subunits of the Phytohemagglutinin Mitogenic Proteins Derived from *P. vulgaris*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, *72*:1388, 1975.

72. MORGAN, W.T.J. & WATKINS, W.M. The Inhibition of the Haemagglutinins in Plants Seeds by Human Blood Group Substances and Simple Sugars. *Brit. J. exp. Path.*, *34*:94, 1953.

73. MORGAN, W.T.J. & WATKINS, W.M. Some Aspects of Biochemistry of the Human Blood-Group Substances. *Brit. Med. Bull.*, *15*:109, 1959.

74. MUELENAERE, H.J.H. de Toxicity and Hamegglutinating Activity of Legumes. *Nature*, *206*:827, 1965.

75. NORDMAN, C.T., de la CHAPELLE, A. & GRÄSBECK, R. The Interrelations of Erythroagglutinating, Leucoagglutinating and Leuocyte-Mitogenic Activies in *Phaseolus vulgaris* Phytohaemagglutinin. *Acta Medica Scandinavia Suppl.*, *412*:49, 1964.

76. NOWAKOVÁ, N. & KOCOUREK, J. Studies on Phytohemagglutinins. XX. Isolation and Characterization of Hemagglutinins from Scarlet Runner Seeds (*Phaseolus Coccineus, L.*) *Biochim. Biophys. Acta*, *359*:320, 1974.

77. NOWEEL, P.C. Phytohemagglutinin: A Initiator of Mitosis in Culture of Normal Human Leucocytes. *Cancer Res.*, *20*:426, 1960.

78. OLIVEIRA, A.L. & SILVA, W.D. da. Imunologia - Alergia - Métodos. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1970. p. 151, 613.

79. PARDOE, G.I. & UHLENBRUCK, G. Characteristics of Antigenic Determinants of Intact Cell Surfaces. *J. Med. Lab. Technol.*, *27*:249, 1970.

80. PECSOK, R.L. & SAUNDERS, D. A Critical Evaluation of Gel Chromatography. In: "Separation Techniques in Chemistry and Biochemistry". R.A. Keller, ed. New York. Marcel Dekker, Inc. 1967. p. 81.

81. PESCE, A., McKAY, R.H., STOLZENBACH, F., CAHN, R. & KAPLAN, N. The Comparative Enzymology of Lactic Dehydrogenase. I. Properties of the Crystalline Beef and Chicken Enzymes. *J. Biol. Chem.*, *239*:1753, 1964.

82. PORETZ, R.D. & GOLDSTEIN, I.J. An Examination of the Topography of the Saccharide Binding Sites of Concanavalin A and of the Forces Involved in Complexation. *Biochemistry*, *9*:2890, 1970.

83. POWRIE, W.D. Extraction of Nitrogenous Constituents from the Navy Bean Seed, *Phaseolus vulgaris*. *J. Agric. Food Chem.* *9*:67, 1961.

84. PUSZTAI, A., GRANT, G. & PALMER, R. Nutritional Evaluation of Kidney Beans (*Phaseolus vulgaris*): The Isolation and Partial Characterization of Toxic Constituents. *J. Sci. Fd. Agric.*, *26*:149, 1975.

85. PUSZTAI, A. & PALMER, R. Nutritional Evaluation of Kidney Beans (*Phaseolus vulgaris*): The Toxic Principle. *J. Sci. Fd. Agric.*, *28*:620, 1977.

86. PUSZTAI, A. & STEWART, J.C. Isolectins of *Phaseolus vulgaris*, Phisico-Chemical Studies. *Biochem. Biophys. Acta*, *536*: 38, 1978.

87. PUSZTAI, A. & WATT, W.B. The Determination of the Molecular Size of Peptides and Proteins by Chromatography on Bio Gel P-100 Columns in Phenol-Acetic Acid-Water (1:1:1, w/v/v) Solvent Mixture. *Biochim. Biophys. Acta*, *214*:463, 1970.

88. PUSZTAI, A. & WATT, W.B. Isolectins of *Phaseolus vulgaris* a Comprehensive Study of Fractionation. *Biochim. Biophys. Acta*, *365*:57, 1974.

89. RÄSÄNEN, V., WEBER, T.H. & GRÄSBECK, R. Crystalline Kidney Bean Leucoagglutinin. *Eur. J. Biochem.*, *38*:193, 1973.

90. RENKIN, E.M. Filtration, Diffusion and Molecular Sieving through Porous Cellulose Membranes. *J. Gen. Physiol.*, *38*:225, 1955.

91. RENKONEM, K.O. Studies on Hemagglutinins Present in Seeds of Some Representatives of the Family of *Leguminosae*. *Ann. Med. exp. Biol. Fenn.*, *35*:66, 1948.

92. RIGAS, D.A. & HEAD, C. The Dissociation of Phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris* by 8,0M Urea and the Separation of the Mitogenic from the Erythroagglutinating Activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *34*:633, 1969.

93. RIGAS, D.A., HEAD, C. & EGINITIS-RIGAS, C. Biophysical Characterization of a Mitogenic Erythro - and Lympho - Agglutinating Phytohemagglutinin (PPHA) of *Phaseolus vulgaris*. *Physio. Chem & Physics*, *4*:153, 1972.

94. RIGAS, D.A. & JOHNSON, E. Studies on the Phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris* and its Mitogenicity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, *113*:800, 1964.

95. RIGAS, D.A. & OSGOOD, E.E. Purification and Properties of the Phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris*. *J. Biol. Chem.*, *212*:607, 1955.

96. ROBBINS, J.H. Tissue Culture Studies of the Human Lymphocyte. *Science*, *146*:1648, 1964.

97. SAINT PAUL, M. Les Hémagglutinines Végétales. *Transfusion*, *4*:3, 1961.

98. SELA, B.A., LIS, H., SHARON, N. & SACHS, L. Isolectins from Wax Bean with Differential Agglutination of Normal and Transformed Mammalian Cells. *Biochim. Biophys. Acta*, *310*:273, 1973.

99. SHARON, N. & LIS, H. Lectins: Cell-Agglutinating and Sugar

Specific Proteins. *Science, 177*:494, 1972.

100. SMITH, C.R. Jr., EARLE, F.R., WOLFF, I.A. & JONES, Q. Comparision of Solubility Characteristics of Selected Seed Proteins. *J. Agr. Food Chem., 7*:133, 1959.

101. SO, L.L. & GOLDSTEIN, I.J. Protein-Carbohydrate Interaction. Application of the Quantitative Precipitin Method to Polysaccharide-Concanavalin A Interaction. *J. Biol. Chem., 242*:1617, 1967.

102. SOBER, H.A., ed. Handbook of Biochemistry Selected Data for Molecular Biology. Cleveland. Chem. Rubber. 1970 p. C-11, n. 70; C-16, n. 394; C-28, n. 1043.

103. SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H. & MOORE, S. Automatic Recording Apparatus for Use in the Chromatography of Aminc Acids. *Anal. Chem., 30*:1190, 1958.

104. SPIEGEL, M.R. Shaum's Outline of Theory and Problems of Estatiscis. Trad. P. Consentino. Rio de Janeiro. Editora McGraw Hill do Brasil, Ltda. 1971. p. 362.

105. SPRINGALL, H.D. The Structural Chemistry of Proteins. London. Butterworths Scientific Publication. 1954. p 135-141.

106. STEINER, R.F. The Chemical Foundation of Molecular Biology Princeton. D. Van Nostrand Company, Inc. 1966. p.76-130.

107. STRONG, F.C. Theorical Basis of the Bouguer-Beer Law of Radiation Absorption. *Anal. Chem., 24*:338, 1952.

108. SUSPLUGAS, J. & COULET, M. Repartition de l'hemagglutinine du *Phaseolus vulgaris L.*, Specialement au Moment de la Germination. *Soc. Pharm. Moutpellier, 4*:1, 1954.

109. TAKAHASHI, T., RAMACHANDRAMURTHY, P. & LIENER, I.E. Some Physical and Chemical Properties of a Phytohemagglutinir Isolated from *Phaseolus vulgaris*. *Biochim. Biophys. Acta 133*:114, 1967.

110. TURNER, R.H. & LIENER, I.E. The Effect of the Selective Removal of Hemagglutinins on the Nutritive Value of Soy-

beans. *J. Agric. Food Chem.*, *23*:484, 1975.

111. VILLELA, G.G., BACILA, M. & TASTALDI, H. Técnicas e Experimentos de Bioquímica. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1973. p. 162.

112. WEBER, T.H. Isolation and Characterization of a Lymphocyte-Stimulating Leucoagglutinin from Red Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 111*:1, 1969.

113. WEBER, T.H., ARO, H. & NORDMAN, C.T. Characterization of Lymphocyte-Stimulating Blood Cell-Agglutinating Glycoproteins from Red Kidney Beans (*Phaseolus vulgaris*). *Biochim. Biophys. Acta*, *263*:94, 1972.

114. WHITAKER, J.R. Determination of Molecular Weights of Proteins by Gel Filtration on Sephadex. *Anal. Chem.*, *35:* 1950, 1963.

115. WRIGLEY, C.W. Analytical Fractionation of Plant and Animal Proteins by Gel Electrofocussing. *J. Chromatog.*, *36*:362, 1968.

116. YACHNIN, S. & SVENSON, R.H. The Immunological and Physico-Chemical Properties of Mitogenic Proteins Derived from *Phaseolus vulgaris*. *Immunology*, *22*:871, 1972.

117. ZALEWSKI, J.C. & SEQUEIRA, L. Inhibition of Bacterial Growth by Extracts from Potato Tissues. *Phytopathology*, *63*:942, 1973.