

CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

**ANÁLISE CROMATOGRÁFICA POR EXCLUSÃO EM AMOSTRAS
DE VENENO DE CASCAVEL IRRADIADAS COM Co-60**

Yoko Murata e José Roberto Rogero

IPEN - PUB - - 154 ,

PUBLICAÇÃO IPEN 154

JULHO/1968

SÃO PAULO

**ANÁLISE CROMATOGRÁFICA POR EXCLUSÃO EM AMOSTRAS
DE VENENO DE CASCAVEL IRRADIADAS COM Co-60**

Yoko Murata e José Roberto Rogero

DEPARTAMENTO DE APLICAÇÕES EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**CNEN/SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SÃO PAULO - BRASIL**

Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

C 11.00

BIOLOGICAL RADIATION EFFECTS

CHROMATOGRAPHY

COBALT 60

GAMMA RADIATION

SNAKES

VENOMS

IPEN - Doc - 3029

Aprovado para publicação em 25/09/87

Nota: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade do(s) autor(es).

ANÁLISE CROMATOGRÁFICA POR EXCLUSÃO EM AMOSTRAS DE VENENO DE CASCAVEL IR-
RADIADAS COM Co-60

Yoko Murata & José Roberto Rogero

RESUMO

As radiações ionizantes tem energia suficiente para quebrar ligações químicas, que resultam em alterações químicas e conseqüente mudanças nas propriedades biológicas. Neste trabalho foi estudado o efeito da radiação gama de Co-60 no veneno de cascavel. Um "pool" de veneno de Crotalus durissus terrificus crotamina positivo foi dissolvido em NaCl 0,15 M e irradiado com Co-60. Foram utilizadas doses de 100, 250, 500, 750, 1500 e 2000 Gy, numa taxa de dose de 1190 Gy/h. Nas doses acima de 500 Gy as soluções se tornaram turvas, sugerindo a ocorrência de mudanças estruturais ou formação de agregados entre os componentes do veneno. A concentração proteica do filtrado foi dosada pelo método de Lowry. Amostras de 1 ml foram eluídas em colunas de Sephadex G-75 e as frações lidas em 230 nm. Foram calculados os coeficientes de participação e as respectivas áreas das três principais frações obtidas.

MOLECULAR EXCLUSION CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS ON ⁶⁰Co IRRADIATED RATTLESNAKE

ABSTRACT

Ionizing radiations are sufficiently energetic to be able of breaking chemical bonds and as result of that molecules of substances present in the irradiated will be chemically changed and their biological properties affected also. In this paper the effects of gamma radiation of Co-60 on the rattlesnake venom were studied. A pool of positive crotamina Crotalus durissus terrificus venom was dissolved in 0,15 M NaCl and irradiated with Co-60. Doses of 100, 250, 500, 750, 1500 and 2000 Gy were applied at the dose rate of 1190 Gy/h. With doses over 500 Gy the solutions became turbid, suggesting the presence of aggregates and structural changes of the proteins. The concentration of proteins from the filtered solution was measured by the Lowry method. One ml samples were measured at 230 nm. The partition coefficients and the a-

reas of the three main fraction obtained were calculated.

INTRODUÇÃO

O veneno de Crotalus durissus terrificus é constituído de componentes protéicos e não protéicos com alta toxicidade. Esta propriedade impede a inoculação de doses capazes de fornecer uma resposta imunológica adequada às necessidades de produção de anti-soros, sem prejudicar o animal produtor. I números agentes físicos e químicos tem sido ensaiados na tentativa de se obter um veneno menos tóxico e com todas as suas propriedades imunogênicas.

Na literatura encontramos alguns estudos de efeito da radiação gama em venenos ofídicos, KANKONKAR et alli⁽²⁾ observaram que nas soluções de veneno de Naja naja, a dose de irradiação necessária para a detoxificação depende da concentração da solução e que até a dose de 20 KGy a imunogenicidade mantém-se inalterada. PURANANANDA⁽⁵⁾ verificou que soluções do veneno de ofídeos da família Elapidae quando irradiadas com raios gama na dose de 30 KGy, perdem a toxicidade e mantêm a capacidade de imunização.

No presente trabalho serão analisadas as alterações da composição do veneno de cascavel, quanto a concentração e peso molecular de seus componentes, quando submetido a diferentes doses de radiação gama.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi preparada uma solução de 2 mg/ml de veneno de cascavel - Crotalus durissus terrificus - em cloreto de sódio 0,15 M. Esta solução foi filtrada em papel Whatman nº 1 e a fração solúvel, submetida a radiação gama numa fonte de Co-60, tipo Gammacell 220 da Atomic Energy of Canada Ltda.. Utilizou-se doses de 100, 250, 500, 750, 1500 e 2000 Gy e a taxa de dose 1190 Gy/h.

Para análise das alterações na composição do veneno produzidas pela radiação avaliou-se:

- a concentração protéica das soluções antes e após a irradiação. Para tanto, foi utilizado o método de Lowry⁽³⁾, modificado por Miller⁽⁴⁾. Todas as amostras irradiadas foram filtradas em papel Whatman nº 1 antes da determinação.
- o perfil cromatográfico das soluções antes e após a irradiação. A cromatografia em gel permite separar substâncias de uma solução de acordo com seu tamanho molecular além de possibilitar a quantificação destas pelo acompanhamento de variáveis físicas no efluente, como a absorção de luz, ati-

vidade óptica e índice de refração.

A coluna utilizada (0,9 x 88 cm) foi preparada com gel Sephadex G-75 em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,5 contendo cloreto de sódio 0,15 M. A eluição foi à temperatura ambiente, num fluxo constante de 9,9 ml/h. Foram aplicadas amostras de 1 ml (980 ug) e coletadas frações de 1,1 ml. O perfil de eluição foi obtido num espectrofotômetro marca Carl Zeiss, no comprimento de onda de 230 nm.

A partir das curvas de eluição, foram calculados os coeficientes de partição (K_{av}) dos três picos com áreas relevantes, denominados "a", "b" e "c", de cada amostra conforme figura 1, da seguinte forma:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad \text{sendo,}$$

V_e = volume efluente da proteína

V_o = volume vazio

V_t = volume total do gel

$$\Delta K_{av} = \frac{\Delta V_e - \Delta V_o}{V_e - V_o} + \frac{\Delta V_t - \Delta V_o}{V_t - V_o} \times K_{av}$$

O coeficiente de partição das substâncias entre a fase líquida e sólida é uma variável independente da compactação do gel na coluna e permite avaliar o tamanho molecular.

A área de cada pico de absorção em 230 nm foi calculada pelo Programa "Analysis"⁽⁸⁾ em operação no CPD do IPEN, considerando a absorvância obtida em cada fração eluída.

RESULTADOS

A dosagem de proteínas das amostras demonstrou que até a dose de 500 Gy não há variação significativa nas concentrações, mas a partir de 750 Gy há uma diminuição proporcional a dose aplicada, como podemos verificar pela tabela 1.

No perfil cromatográfico do veneno de cascavel não irradiado podemos observar vários picos, evidenciando a presença de diferentes proteínas^(6, 7) (figura 1).

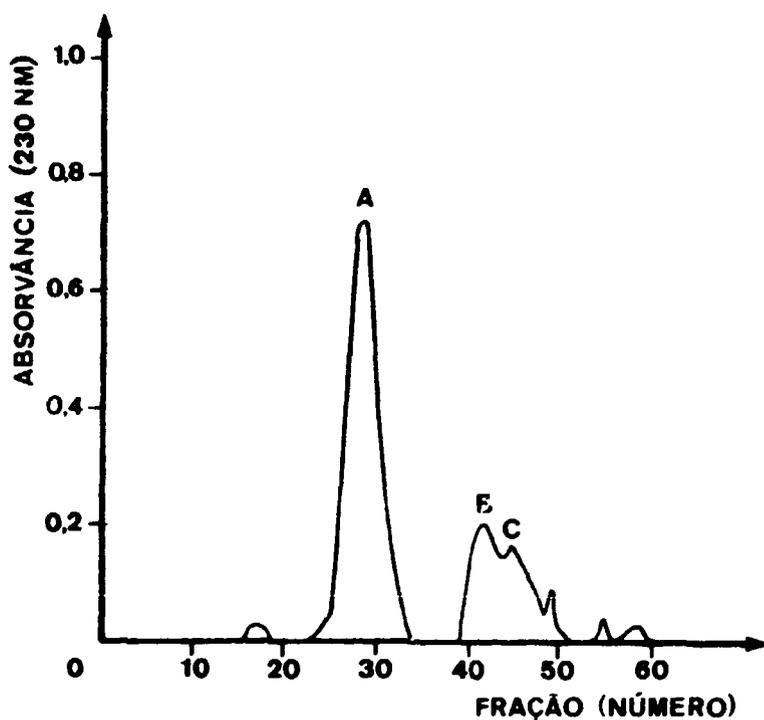


FIGURA 1 - Cromatografia de Exclusão Molecular em Sephadex G-75 do veneno não irradiado. Volume da amostra: 1 ml (980 μ g); dimensão da coluna: 0,9 x 88 cm; fluxo: 9,9 ml/h; eluente: tampão fosfato 0,05 M, pH 6,5 com 0,15 M de cloreto de sódio.

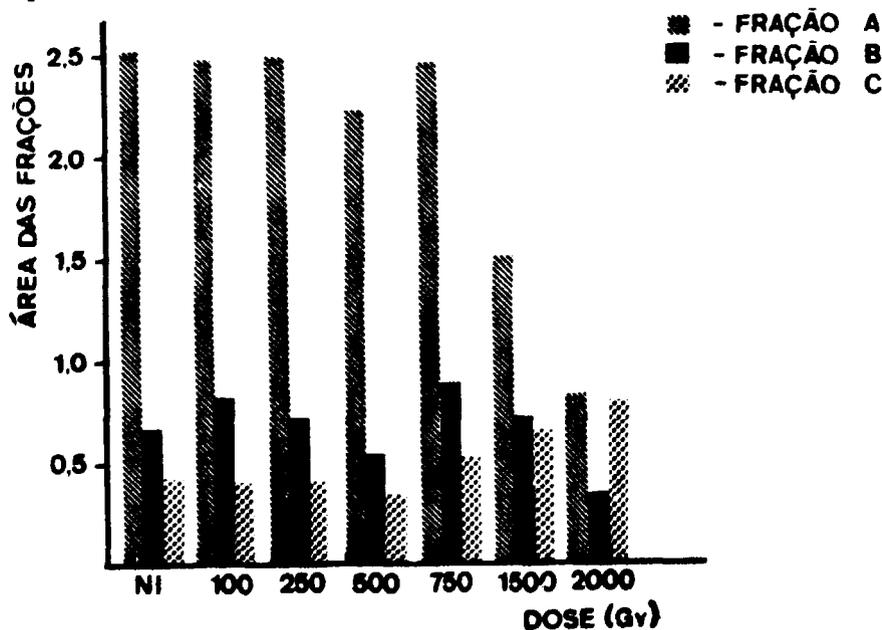


FIGURA 2 - Área das três principais frações do veneno de cascavel em 250 nm, das amostras não irradiada (NI) e submetidas às várias doses de radiação gama.

TABELA 1 - CONCENTRAÇÃO PROTÉICA DAS AMOSTRAS

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g/ml}$)
veneno não irradiado	2098
100 Gy	2149
250 Gy	2098
500 Gy	2038
750 Gy	1749
1500 Gy	1291
2000 Gy	984

TABELA 2 - COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

AMOSTRA	PICO "a" Kav (ΔKav)	PICO "b" Kav (ΔKav)	PICO "c" Kav (ΔKav)
veneno não irradiado	0,33 (0,02)	0,73 (0,03)	0,84 (0,04)
100 Gy	0,33 (0,02)	0,71 (0,03)	0,82 (0,04)
250 Gy	0,33 (0,02)	0,70 (0,03)	0,82 (0,04)
500 Gy	0,36 (0,04)	0,72 (0,05)	0,86 (0,06)
750 Gy	0,36 (0,04)	0,73 (0,05)	0,86 (0,06)
1500 Gy	0,35 (0,04)	0,71 (0,06)	0,86 (0,06)
2000 Gy	0,34 (0,02)	0,77 (0,04)	0,90 (0,04)

TABELA 3 - ÁREAS DOS PRINCIPAIS PICOS DE ABSORÇÃO

AMOSTRA	PICO "a" ÁREA ($\Delta\text{área}$)	PICO "b" ÁREA ($\Delta\text{área}$)	PICO "c" ÁREA ($\Delta\text{área}$)
veneno não irradiado	2527 (130)	640 (76)	433 (68)
100 Gy	2459 (200)	804 (82)	391 (58)
250 Gy	2475 (224)	707 (92)	403 (72)
500 Gy	2236 (147)	520 (50)	315 (42)
750 Gy	2273 (177)	861 (74)	513 (59)
1500 Gy	1526 (162)	731 (120)	643 (114)
2000 Gy	822 (102)	318 (87)	781 (126)

Pela tabela 2 podemos verificar que não há variação significativa no coeficiente de partição. A análise destes dados indica que até a dose de 750 Gy as frações presentes no veneno não foram afetadas de forma significativa. Nas doses de 1500 e 2000 Gy observamos uma redução das áreas das frações "a" nas proporções de 60 a 30%, respectivamente. A fração "b" na dose de 2000 Gy apresentou uma redução de 50% em relação ao não irradiado. As frações "c" das doses de 1500 e 2000 Gy, sofreram um aumento de 50 e 80%, respectivamente, em relação ao não irradiado (tabela 3 e figura 2).

DISCUSSÃO

As proteínas quando irradiadas em solução são excitadas e ionizadas por ação direta ou indireta; ação direta quando a energia da radiação é depositada nas macromoléculas e indireta quando esta sofre ação dos produtos da radiólise da água. Nesta interação pode ocorrer rompimentos de ligações peptídicas formando fragmentos de diferentes pesos moleculares. Os radicais livres formados nas moléculas podem se arranjar, alterando a estrutura proteica levando ou não à diminuição da solubilidade, assim como, combinarem-se com fragmentos ou moléculas formando agregados de diferentes pesos moleculares (1).

Os primeiros efeitos são observados a partir de 750 Gy, onde ocorre alteração da solubilidade do veneno. A precipitação sugere mudanças estruturais ou formação de agregados entre seus componentes, conforme o processo descrito acima. No entanto, não observa-se diferenças qualitativas significativas quando compara-se os perfis cromatográficos dos venenos não irradiado e irradiado. Os perfis obtidos medindo-se as frações proteicas em 230nm, pois neste comprimento de onda se detecta as ligações peptídicas. Este procedimento permitiu detectar a presença de fragmentos proteicos que não possuam anéis aromáticos. Classicamente, o perfil cromatográfico é obtido pela absorção dos anéis aromáticos em 280 nm. A avaliação destes perfis mostram que mesmo nas doses mais altas (1500 e 2000 Gy) não há fragmentos menores que 5000 daltons, nem agregados solúveis. A análise dos valores de coeficientes de partição permitiu que as proteínas remanescentes na solução não alteraram de forma significativa seu tamanho molecular.

O cálculo das áreas das três principais frações do perfil cromatográfico denominadas "a", "b" e "c" (figura 2) mostram que até a dose de 750 Gy a composição do veneno, avaliada pela proporção das proteínas presentes na amostra, se mantém praticamente inalterada. Já nas doses de 1500 e 2000 Gy há mudanças na relação entre as três frações. Estas alterações sugerem que a

fração "a" é mais radiosensível que a fração "c".

De um modo geral, podemos verificar que as proteínas presentes no veneno de cascavel são radiorresistentes pois não mostram alterações marcantes até a dose de 1500 Gy. Esta observação nos sugere que a irradiação parece ser uma abordagem útil para diminuir as propriedades tóxicas do veneno de cascavel, preservando suas características biológicas e principalmente imunogênicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BUTLER, R.; LAND, E.J.; SWALLOW, J. Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. Radiat. Phys. Chem., 24 (314): 273 - 82, 1984.
2. KANKONKAR, S.R.; KANKONKAR, R.C.; GATTONDE, B.B. Irradiated cobra (*Naja naja*) venom for biomedical applications. In: Radiosterilization of medical products. Vienna, IAEA, 1975. p. 253 - 62.
3. LOWRY, O.H. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265, 1951.
4. MILLER, G.L. Protein determination for large numbers of samples. Anal. Chem., 31: 964, 1959.
5. PURANANANDA, C. Studies on effects of radiation on snake venoms with special aspects on their sterilization. International Atomic Energy Agency, Vienna. (IAEA-R-661).
6. ROGERO, J.R. Toxinas do veneno de *C. d. terrificus*: interação proteína - proteína e cinética de troca isotópica hidrogenio-trício. São Paulo, 1979. (Tese de doutoramento, Instituto de Energia Atômica). (IEA-119).
7. TADEDA, A.K.; BARBOSA, S.F.C.; COSTA, L.M.; ADELINO, M.G.F. Fracionamento do veneno de *Crotalus durissus terrificus* por cromatografia de exclusão molecular. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 27 (3): 115-22, 1985.
8. VENTURINI, L. & VANDENFUT, G.C. Comunicação pessoal.