

Efeitos da alta pressão hidrostática na renaturação de proteínas agregadas por radiação ionizante

Mônica Nascimento da Silva e Nanci do Nascimento
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

O gênero *Crotalus* tem uma única espécie no Brasil, a *C.d.terrificus* que se distribui geograficamente pelo Sul e Oeste até Pará.

A subespécie *C.d.terrificus* tem 5 componentes identificados: convulxina, delta-toxina, gírotoxina, crotoxina e crotamina.

Crotamina: possui massa molecular de 4,88 kDa, composta por 42 aminoácidos, 9 lisinas e 2 argininas, pH básico e pI 10,3. Encontra-se ligação de proteínas (cisteínas) interligadas por 3 pontes dissulfeto, conferindo alta estabilidade conformacional à crotamina [1].

Neurotoxina isolada a partir da peçonha de *C.d.terrificus* (cascavel sul – americana) foi a primeira proteína estudada no Brasil. Isolada em 1950 por Moura-Gonçalves e Vieira. Tem como característica a intensa paralisação dos membros posteriores.

Uma forma de diminuir a toxicidade do veneno, preservando suas propriedades imunológicas, é através da radiação ionizante. A radiação gama tem se mostrado capaz de destoxicar venenos e toxinas em soluções aquosas.

As radiações ionizantes afetam a estrutura das moléculas devido à destruição das suas ligações químicas [3].

Mas através de outra técnica como submetendo a alta pressão; teríamos conseqüentemente a conformação protéica estabelecida, e assim um veneno irradiado muito similar ao veneno não irradiado.

A aplicação de alta pressão induz mudanças estruturais nas proteínas que dependem de pH, da temperatura e o meio

iônico das propriedades intrínsecas das mesmas[2].

Portanto, a junção da irradiação, seguida da aplicação de altas pressões nas proteínas proporcionaria resultados como: a diminuição de toxicidade sem alteração significativa na conformação das toxinas do veneno; otimização da produção de soros antiofídicos e a busca de novos fármacos e vacinas.

OBJETIVO

Isolar a crotamina a partir do veneno bruto da *C.d.terrificus* utilizando técnicas cromatográficas e aplicar técnicas de Fluorescência e Dicroísmo Circular para o estudo conformacional da toxina nativa e irradiada.

METODOLOGIA

A primeira etapa do trabalho consistiu no isolamento da crotamina através da cromatografia de exclusão molecular. Foi utilizado HPLC e a cromatografia por troca iônica. Irradiação das proteínas: A crotamina isolada pelo processo anterior, foi diluída em solução salina (0,5 mg/mL) e submetida à ação de raios gama de uma fonte de ⁶⁰Co (GammaCell, Atomic Agency of Canadá Ltd) em uma dose total de 2 kGy e a taxa de dose de 2,09 kGy/h. Análise de Fluorescência: É uma técnica que permite a análise estrutural da proteína. Dicroísmo Circular (CD): A técnica de CD permite investigar as alterações na estrutura secundária das proteínas.

RESULTADOS

Os resultados obtidos são mostrados a seguir, nas figuras 1 a 4:

Isolamento da crotamina

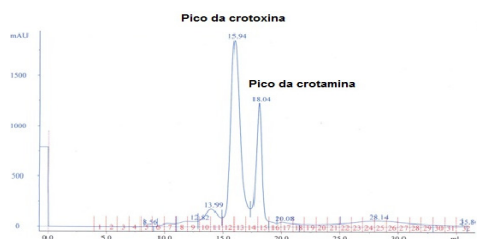


Figura 1: Cromatografia do veneno total da *C.d.terrificus*.

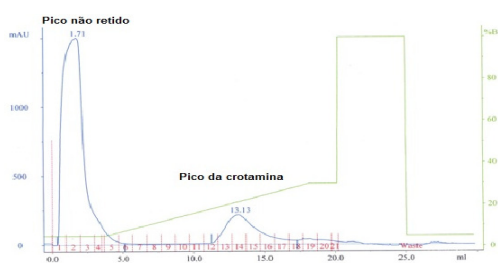


Figura 2: Recromatografia da crotamina.
2. Fluorescência

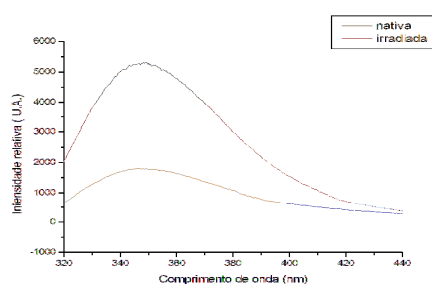


Figura 3: Análise de fluorescência da crotamina.

3. Dicroísmo Circular

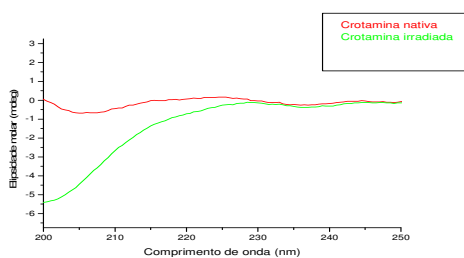


Figura 4: Análise de dicroísmo circular da crotamina.

CONCLUSÕES:

A crotamina foi isolada por técnicas cromatográficas de exclusão molecular e troca iônica. A estrutura secundária foi modificada após irradiação com 2 kGy. A mudança na estrutura secundária induzida pela radiação gama; mostrada na figura [4], poderia ser responsável pela diminuição de toxicidade devido a diminuição de alfa-hélice e folha beta da crotamina irradiada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]FADEL, V. **Estrutura tridimensional da crotamina extraída do veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus* utilizando Ressonância Magnética Nuclear Homonuclear**. 2003. Tese – Doutorado. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
- [2]Pflanzler, Bertelli Sérgio e cols. **Revisão: Efeitos do processamento por alta pressão hidrostática nas características físico-químicas, microbiológicas e nutricionais do leite**. Braz. J.Food Technol. V.11, n.4, p.241-251, out.\dez.2008.
- [3]Costa, A.T. **Efeitos dos produtos de radiólise da água na crotamina**. Publicação IPEN 142, julho\1988. São Paulo.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq, Ipen, CNEN