

REC-05

CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO EM SEMENTES DE DIFERENTES ESPÉCIES FLORESTAIS DA AMAZÔNIA

Larissa Ramos Chevreuil⁽¹⁾, Silvana Cristina Pando⁽²⁾, José Francisco de Carvalho Gonçalves⁽³⁾, Adamir da Rocha Nina Júnior⁽¹⁾

Bolsista PIBIC-CNPq/INPA¹; ⁽²⁾ Pesquisadora UFAM; ⁽³⁾ Pesquisador MCT/INPA

A diversidade biológica da flora Amazônica vem sendo cada vez mais valorizada como fonte potencial de informações genéticas, químicas, ecológicas e microbiológicas (Clay *et al.*, 2000). Essa diversidade vegetal, quando devida e sistematicamente associada a metodologias biotecnológicas que viabilizem a obtenção de proteínas, em particular lectinas, podem exibir elevado potencial de aplicação industrial e significa o verdadeiro equilíbrio entre o uso e a preservação do ambiente florestal. As lectinas são proteínas ou glicoproteínas capaz de interagir específica e reversivelmente com carboidratos, aglutinar células animais e/ou vegetais e precipitar polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolípídeos (Jacobson & Doyle, 1996). As lectinas de legume são as proteínas vegetais mais estudadas, pois correspondem de 2 a 10% das proteínas solúveis de sementes maduras e dentre as funções das lectinas destaca-se a toxicidade destas proteínas contra várias espécies de fungos fitopatogênicos e insetos (Freire *et al.*, 2002; Macedo *et al.*, 2006). As sementes de *Tachigali plumbea* (*Tp*) e *Sesbania exasperata* (*Se*) foram trituradas e o material pulverizado foi submetido à extração salina (NaCl 0,15 M) e posterior diálise. O extrato total obtido foi centrifugado e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação de proteínas e para as etapas de caracterização da AHE, incluindo os ensaios com açúcares, o efeito de agentes quelantes e eletroforese em SDS-PAGE. O teor protéico para o extrato de *Tp* foi de 32,37 µg/mL e para *Se* foi 106,81 µg/mL. O ensaio de hemaglutinação é o método mais utilizado para a detecção de lectinas, por isso, nesse estudo utilizou-se eritrócitos provenientes de camundongo, hamster e rato branco, uma vez que a especificidade da proteína por açúcares pode variar de acordo com o padrão de glicosilação dos eritrócitos. Os extratos totais de *Se* e de *Tp* ocasionaram hemaglutinação, em todos os eritrócitos testados, na presença de 5,3 µg e 1,6 µg de proteína, respectivamente. Após diluição serial desses extratos, constatou-se que a concentração mínima para promover a hemaglutinação foi de 0,33 µg e 0,8 µg de proteína, respectivamente, sugerindo a presença de proteínas da classe das lectinas nos extratos totais destas espécies. Os ensaios com 100 mM de

glicose, galactose, lactose e sacarose não inibiram a AHE dos extratos de *Tp*, sugerindo que as proteínas com AHE não têm afinidade por estes açúcares. Resultados similares foram observados por Pando (2001). O EDTA, um agente quelante de cátions divalentes, quando foi adicionado em concentrações de 12,5 mM e 25 mM, não inibiu a AHE do extrato de *Se*. No entanto, quando prosseguiu-se a diluição serial do EDTA detectou-se inibição da AHE, sugerindo que a presença de cátions divalentes possam inibir a hemaglutinação, ao contrário da maioria das lectinas obtidas de sementes de leguminosas que, geralmente, perdem a AHE na presença de EDTA (Pando *et al.*, 2002). A AHE observada no extrato total de *Tp*, não sofreu influência do EDTA, sugerindo que as proteínas presentes no meio não requerem íons divalentes para a sua atividade. Analisando o perfil protéico de *Se*, foi possível detectar maior ocorrência de bandas protéicas com massa molecular aparente entre 30 kDa e 10 kDa. No que se refere ao extrato total da espécie *Tp*, pôde-se observar maior ocorrência de proteínas com baixa massa molecular. Na presença de DTT (ditiotreitól), foi possível verificar que não houve diferença no padrão de migração das proteínas no gel, indicando que proteínas oligoméricas não são prevalentes em ambos os extratos. Conclui-se que, possivelmente, as sementes das espécies *Se* e *Tp* apresentam lectinas, uma vez que houve hemaglutinação de diferentes eritrócitos e prevalência de proteínas com massa molecular aparente de 30 kDa, tal como ocorre com a maioria das lectinas de leguminosas (Rüdiger, 1998).

- Clay, J. W.; Sampaio, P. de T. B.; Clement, C. R. 2000. *Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de utilização*. 1 ed. Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Manaus, AM. 409p.
- Freire, M. G. M.; Gomes, V. M.; Corsini, R. E.; Machado, L. T.; Simone, S. G.; Novello, J. C., Marangoni, S.; Macedo, M. L. R. 2002. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiology and Biochemistry*. 40: 61-68.
- Jacobson, R.L. & Doyle, R.J. 1996. Lectin-parasite interactions, *Parasitol.*, v.12, p.55-61.
- Macedo, M.L.R.; Freire, M.G.M.; Silva, M.B.R.; Coelho, L.M.B.B. 2006. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera:Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*. In press, v. 17.
- Pando, L. A. 2001. *Caracterização físico-química e biológica de proteínas isoladas de sementes de leguminosas: lectinas e inibidores de proteinases*. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular, área de concentração em Bioquímica). Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP): Instituto de Biologia. Campinas, SP.
- Pando, S. C.; Macedo, M. L. R.; Freire, M. G. M.; Toyama, M. H.; Novello, J. C.; Marangoni, S. 2002. Biochemical characterization of a lectin from *Delonix regia* seeds. *Journal of Protein Chemistry*. 21 (4): 279-285.
- Rüdiger, H. 1998. Plant lectins – more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure and possible functions of plant lectins. *Acta Anat.*, 161: 130-152.