

## **PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA ATIVIDADE DE LECTINAS PRESENTES EM SEMENTES DE *Swartzia laevis* (PAPILIONOIDEAE-FABACEAE)**

Paulo Abraão Cavalcante MARANHÃO<sup>1</sup>; Andréia Varmes FERNANDES<sup>2</sup>; Larissa Ramos CHEVREUIL<sup>3</sup>; José Francisco de Carvalho GONÇALVES<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; <sup>2</sup>Colaboradora/Pesquisadora INPA; <sup>3</sup>Coorientadora Bolsista PCI/CNPq; <sup>4</sup>Orientador/Pesquisador INPA.

### **1. Introdução**

A possibilidade de agregar valor a biomoléculas oriundas da flora amazônica representa uma alternativa bastante promissora, uma vez que diferentes componentes do metabolismo vegetal primário e/ou secundário têm sido investigados quanto a sua aplicabilidade. Dentre estas biomoléculas aquelas de origem protéica são em grande parte encontradas em sementes (Gonçalves *et al.*, 2002 ; Chevreuil *et al.*, 2009). As lectinas são um exemplo dessas proteínas e, apresentam a propriedade de se ligarem específica e reversivelmente a carboidratos, promovendo a aglutinação de células e precipitando glicoproteínas (Jacobson e Doyle, 1996). Nas plantas, essa classe protéica está associada à função de defesa contra patógenos e na simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium* (Peumans e Van Damme, 1995). Considerando a importância das lectinas vegetais e, que estudos preliminares a respeito da prospecção dessas proteínas em sementes demonstram grande potencial de espécies da família *Fabaceae*, o objetivo desta pesquisa foi isolar e caracterizar a atividade de lectinas presentes em sementes de *Swartzia laevis*, de modo a contribuir para o entendimento da interação entre lectinas e carboidratos.

### **2. Materiais e métodos**

Sementes de *Swartzia laevis*, pertencentes ao banco de leguminosas do INPA e em estudo no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal foram trituradas em moinho analítico. O material finamente pulverizado, foi homogeneizado em solução de NaCl 0,15 M (10% p/v) durante 2 horas, centrifugado a 5000 g, durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi dialisado contra água destilada, durante 48 horas e, posteriormente, liofilizado, resultando no extrato protéico. Para os ensaios de atividade hemaglutinante (AHE), amostras de eritrócitos de diferentes animais (coelho, camundongo, hamster e rato branco) foram coletadas no Biotério do INPA. Para purificação da lectina, o extrato protéico foi submetido a cromatografia de troca iônica (DEAE-Sepharose), de afinidade ( $\alpha$ -lactose-agarose) e exclusão molecular (PD-10 Desalting). As frações com atividade hemaglutinante, provenientes das cromatografias foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

### **3. Resultados e discussão**

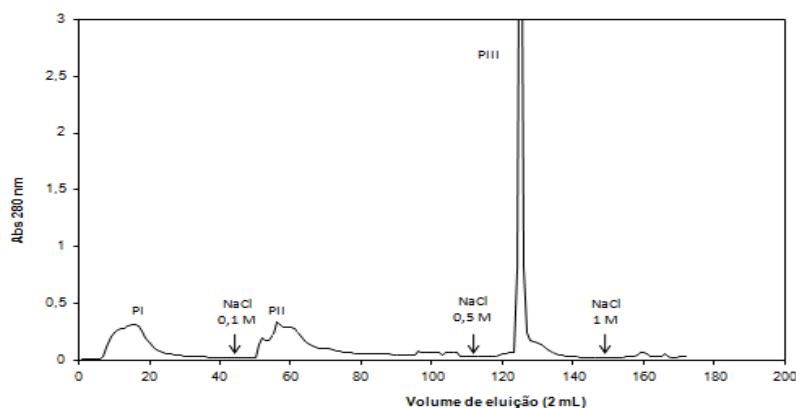
O extrato protéico de *S. laevis* apresentou hemólise, ou seja, ruptura dos eritrócitos, para todos os eritrócitos testados (Tabela 1), impossibilitando, desta forma, a avaliação da presença ou ausência de aglutinação dos eritrócitos, uma vez que, para a detecção da AHE faz-se necessário que os eritrócitos estejam íntegros, possibilitando a interação da lectina (quando presente no extrato e com afinidade específica) com o carboidrato presente na superfície do eritrócito.

Considerando que todos os eritrócitos testados apresentaram hemólise quando incubados com extrato protéico de *S. laevis*, outras seis espécies, também pertencentes ao gênero *Swartzia* (*S. ingifolia*, *S. sericea*, *S. argentea*, *S. polyphylla*, *S. pendula* e *S. longistipitata*), foram submetidos a ensaios de detecção de AHE, demonstrando assim como no ensaio de *S. laevis*, a presença de hemólise, característica esta comum a este gênero, o que pode estar associado à evolução dessas espécies.

A atividade hemolítica, apresentada pelos eritrócitos quando incubados com os extratos protéicos, pode ser atribuída à presença de moléculas, como por exemplo, saponinas, responsáveis pela ruptura dos eritrócitos. Esta hemólise pode ser reduzida e/ou eliminada, adotando-se outras metodologias de tratamento dos eritrócitos ou por meio de cromatografias, com a finalidade de separar tais moléculas da proteína alvo (lectina).

Um estudo envolvendo uma lectina de sementes de *Swartzia pickelli*, tratou os eritrócitos de diferentes animais com gluteraldeído, sendo possível observar AHE para eritrócitos de boi, cachorro, carneiro, cavalo, galinha, pato e porco (Cavalcanti e Coelho, 1990).

O extrato protéico de *S. laevicarpa* aplicado em coluna DEAE-Sepharose resultou em três picos distintos, PI, PII e PIII (Figura 1).



**Figura 1** – Cromatografia de troca iônica (DEAE Sepharose Fast Flow) do extrato protéico de *S. laevicarpa*. Amostra: 2,5 mg/ mL. Tampão de equilíbrio: Tris-HCl 0,05 M pH 8,0. Tampões de eluição: Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 contendo 100 mM de NaCl, Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 contendo 500 mM de NaCl e Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 contendo 1 M de NaCl. A eluição foi monitorada espectrofotometricamente a  $\lambda=280$  nm.

Nas frações de absorvância máxima de cada pico foram realizados ensaios de AHE, onde observou - se que apenas a fração 56, correspondente ao PII, aglutinou eritrócitos de coelho (Tabela 1). As frações PI e PIII não apresentaram AHE, com ocorrência de hemólise em PIII.

**Tabela 1** – Atividade hemaglutinante (AHE) das frações de absorvância máxima provenientes da cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose de *S. laevicarpa*, utilizando eritrócitos de coelho.

Frações	Atividade hemaglutinante (AHE)
16 (PI)	-
56 (PII)	+
125 (PIII)	H

(-) ausência de aglutinação; (+) presença de aglutinação; (H) hemólise

Estes resultados demonstram que foi possível separar moléculas que provocam hemólise, sendo possível visualizar AHE em eritrócitos de coelho, indicando a possível presença de lectinas no extrato protéico de *S. laevicarpa*.

Considerando a presença de AHE na fração 56, novos ensaios de aglutinação foram realizados para as frações 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 e 58, que constituem o PII. A partir desses resultados, observou - se que as frações 51, 52, 55, 56 e 57 apresentam maior título hemaglutinante (concentração mínima de proteína que promove aglutinação) (Tabela 2).

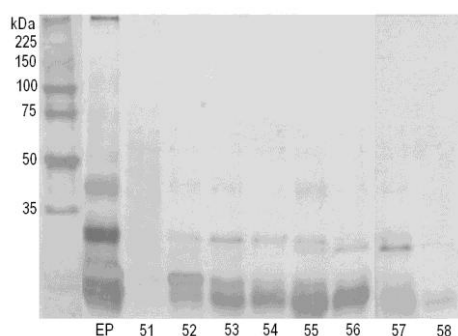
**Tabela 2** – Título hemaglutinante (T.H.) das frações correspondentes ao PII da cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose de *S. laevicarpa*, utilizando eritrócitos de coelho.

Frações	T.H
51	$2^6$
52	$2^6$
53	$2^3$
54	$2^3$
55	$2^6$
56	$2^6$
57	$2^6$
58	$2^2$

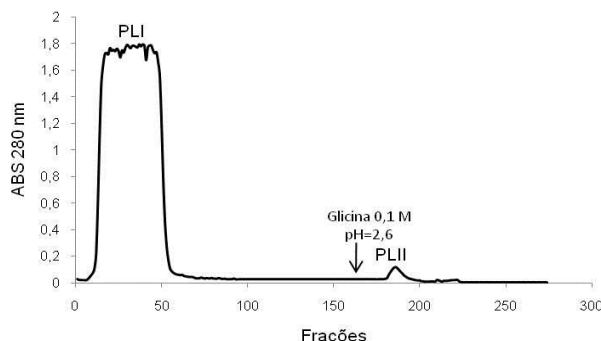
O perfil protéico do extrato e das frações que correspondem ao PII, provenientes da cromatografia de troca iônica (DEAE Sepharose), demonstra a purificação parcial da lectina, visto a presença de uma banda protéica de, aproximadamente, 30 kDa nas frações de 52 a 57, correspondente provavelmente às lectinas, visto que a literatura científica relata que essas proteínas apresentam massa molecular em torno de 30 kDa (Figura 2).

Estudos realizados com sementes de *Luetzelburgia auriculata* e *Phaseolus coccineus* isolaram lectinas com massa molecular em torno de 29 kDa, confirmando o padrão de massa molecular para lectinas, encontrada em *S. laevicarpa* (Oliveira *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2008).

Como resultado da cromatografia em  $\alpha$ -lactose-agarose obteve-se dois picos distintos, denominados PLI e PLII, sendo a fração PLII aquela com afinidade pela  $\alpha$ -lactose (Figura 3). As frações referentes à PLII foram testadas quanto à AHE, apresentando hemaglutinação para os eritrócitos de coelho, indicando uma purificação das possíveis lectinas, com afinidade específica pela lactose.



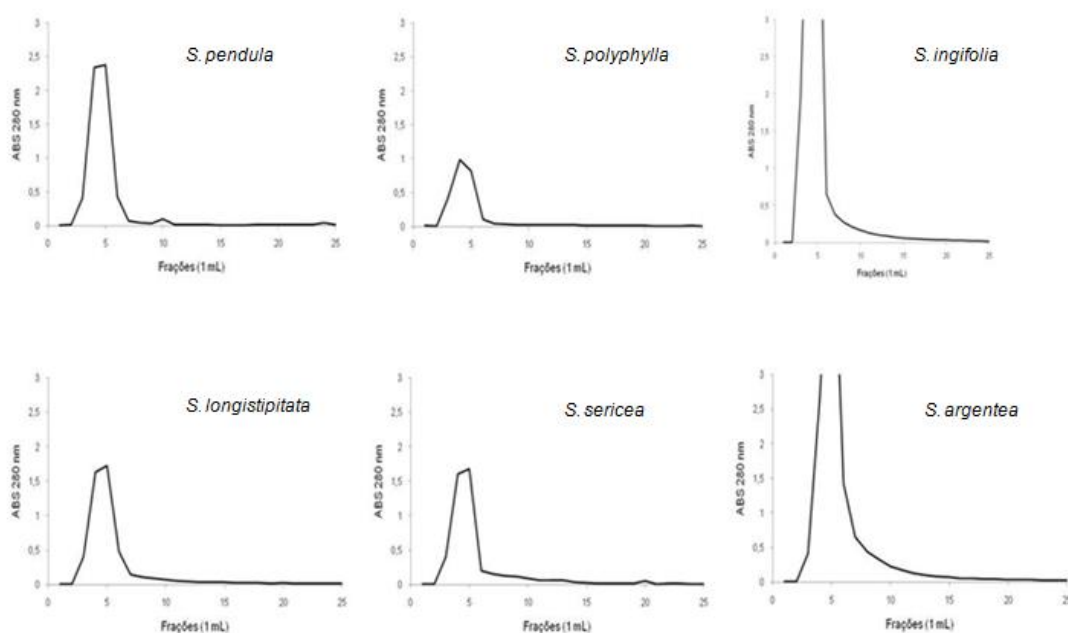
**Figura 2** – Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) contendo SDS. Marcador de massa molecular. Frações 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 e 58 correspondentes ao PII da DEAE Sepharose.



**Figura 3** - Cromatografia de afinidade em  $\alpha$ -lactose-agarose do extrato protéico de *S. laevicarpa*. Tampão de equilíbrio: Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M; CaCl<sub>2</sub> e MnCl<sub>2</sub> 5,0 mM. Tampão de eluição: Glicina 0,1 M pH 2,6. A eluição foi monitorada espectrofotometricamente a  $\lambda=280$  nm.

Estudos realizados com sementes de *Canavalia ensiformes* e *Dioclea grandiflora* isolaram lectinas a partir de uma resina lactose-sepharose, demonstrando, desta forma, a importância desta etapa cromatográfica para a purificação de lectinas de leguminosas (Melgarejo e Pérez, 2005).

Ainda com a finalidade de separar as moléculas responsáveis pela atividade hemolítica observada para as outras seis espécies pertencentes ao gênero *Swartzia*, os extratos protéicos foram aplicadas em uma cromatografia de exclusão molecular, PD-10 Desalting (Figura 4).



**Figura 4** - Cromatografia de exclusão molecular em PD-10 Desalting dos extratos protéicos de espécies pertencentes ao gênero *Swartzia*. Tampão de eluição: Tri-HCl 50 mM pH 8,0. A eluição foi monitorada espectrofotometricamente a  $\lambda = 280$  nm.

Após a aplicação dos extratos protéicos das *Swartzias*, observou-se a presença de um único pico para todas as espécies e, após os testes de AHE, verificou-se a reversão do processo hemolítico dos extratos protéicos de *S. argentea*, *S. ingifolia*, *S. longistipitata* e *S. pendula*, indicando a eficiência desta resina cromatográfica em separar moléculas responsáveis pela hemólise dos eritrócitos testados, como por exemplo, as saponinas.

#### 4. Conclusão

Os extratos protéicos das sete espécies pertencentes ao gênero *Swartzia* estudadas promovem hemólise dos eritrócitos de camundongo, hamster, rato branco e coelho, sugerindo a presença de saponinas.

A cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose proporcionou a purificação parcial da lectina presente em sementes de *S. laevicarpa*, além de promover a separação de moléculas hemolíticas. Adicionalmente, a cromatografia de afinidade em  $\alpha$ -lactose-agarose também é eficiente em purificar parcialmente as lectinas, com atividade específica para a  $\alpha$ -lactose.

O efeito hemolítico observado nos extratos protéicos das espécies do gênero *Swartzia* foi revertido para quatro das seis espécies testadas, após a aplicação da cromatografia em PD-10 Desalting.

As espécies *S. argentea*, *S. ingifolia*, *S. longistipitata* e *S. pendula* apresentam potencial para futuros estudos envolvendo o isolamento de lectinas e possíveis aplicações científicas das lectinas desse gênero.

#### 5. Referências bibliográficas

- Cavalcanti, M.S.M.; Coelho, L.C.B.B. 1990. Isolation and partial purification of a lectin from *Swartzia pickelli* Killip (white jacaranda). Mem.Inst.Oswaldo Cruz, 85: 371-372
- Chen, J.; Lin, B.; Ji, N.; Zhou, J.; Damme, V.; Balzarini, J.; Chen, F.; Bao, J. 2008. A novel siálico acid-specific lectin from *Phaseolus coccineus* seeds with potent antineoplastic and antifungal activities. Phytomedicine, 16: 352-360.

Chevreuril, L.R.; Gonçalves, J.F.C.; Bariani, A.; Rodrigues, J.V.F.C.; Pando, S.C. 2009. Detecção de inibidores de tripsina e atividade hemaglutinante em sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia. *Acta Amazonica*, 39(1): 189-196.

Gonçalves, J.F.C.; Fernandes, A.V.; Oliveira, A.F.; Rodrigues, L.F.; Marenco, R. 2002. Primary metabolism components of seeds from Brazilian Amazon tree species. *Plant Physiology*, 14: 139 – 142.

Jacobson, R.L.; Doyle, R.J. 1996. Lectin – Parasite Interactions. *Parasitology Today*, 12(2): 55 – 61.

Melgarejo, L.M.; Vega, N.; Pérez, G. 2005. Isolation and characterization of novel lectins from *Canavalia ensiformis* DC and *Dioclea grandiflora* Mart. Ex Benth seeds. *Braz. J. Plant Physiol*, 17: 315-324.

Oliveira, S.R.M.; Nascimento, A.E.; Lima, M.E.P.; Leite, Y.F.M.M.; Benevides, N.M.B. 2002. Purification and characterisation of a lectin from the red marine alga *Pterocladia capillacea* Santel & Hommers. *Revista Brasileira de Botânica*, 25: 397-403.

Peumans, W.J.; Van Damme, E.J.M. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol*, 109: 347-352.

Sharon, N.; Lis, H. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14: 53-62.