

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LECTINA(S) NAS CASCAS DAS SEMENTES DE *Dioclea bicolor*

Maria Eliza Caldas dos SANTOS¹; Andreia Varmes FERNANDES²; José Francisco de Carvalho GONÇALVES³

¹Bolsista PIBIC/CNPq; ²Orientadora CDAM/INPA; ³Co-orientador CDAM/INPA

1. Introdução

A bioprospecção de plantas silvestres da Amazônia em busca de moléculas de interesse biotecnológico e/ou outros bioprodutos florestais não madeiráveis pode confirmar a lógica de sustentabilidade (Fernandes *et al.* 2012). Com esta expectativa, diversos estudos científicos tem relacionado a atividade biológica de defesa pelas plantas a um grupo especial de proteínas, denominadas lectinas. Elas são ubíquas a todos os seres vivos, porém são mais comumente encontradas em sementes de *Fabaceae* (Dash 2013). Estima-se que de 2% a 10% do conteúdo total de proteínas solúveis (Gatehouse *et al.* 1995; Rüdiger e Gabius 2001). A ampla ocorrência de lectinas em tecidos vegetais e a grande especificidade de ligação a carboidratos despertou o interesse pelas investigações de varias funções atribuídas a estas proteínas, entre essas funções a proteção contra patógenos (Lima *et al.* 2013).

Ainda considerando o alto teor de proteínas nos tecidos de estocagem de sementes de *Fabaceae* e que há poucos estudos a respeito do isolamento e da atividade antifúngica de lectinas em tecidos de estocagem e nas cascas de *Fabaceae* pertencentes à flora Amazônica, o objetivo deste trabalho foi extrair lectina(s) na casca da semente de *Dioclea bicolor*, além de purificar e caracterizar esta(s) proteína(s) visando aplicações biotecnológicas.

2. Material e Métodos

As cascas das sementes de *Dioclea bicolor*, obtidas no município de Benjamin Constant (AM), foram trituradas em moinho analítico de facas até a obtenção de um material finamente pulverizado. Em seguida este material foi homogeneizado em diferentes soluções salinas (Tabela 1). As suspensões (10% p/v) foram mantidas sob leve agitação, a temperatura de 37 °C e centrifugada a 11.000 x g durante 20 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram dialisados contra água destilada durante 72 horas, e liofilizados resultando no extrato proteico.

A estimativa da concentração proteica dos extratos liofilizados foi feita utilizando a metodologia de Bradford (1976).

A atividade hemaglutinante (AHE) foi determinada pelo método de diluição seriada em placas de microtitulação. Inicialmente, a cada um dos poços adicionou-se 25 µL da solução salina (NaCl 0,15 M), em seguida 25 µL da amostra (extrato proteico na concentração de 5 mg / mL) no primeiro poço e, nos demais seguiu-se de uma diluição seriada até o último poço. Por ultimo, foram adicionados 25 µL da suspensão de eritrócitos de sangue de coelho a 2% v/v.

A fim de estimar o perfil eletroforetico dos extratos proteicos das cascas das sementes de *Dioclea bicolor*, as amostras foram submetidas a eletroforese em condições desnaturantes. Foram preparados géis de poliacrilamida (SDS-PAGE), onde após a eletroforese, os géis foram corados com Comassie Brilliant Blue.

Tabela 1. Soluções utilizadas na extração proteica das cascas das sementes de *Dioclea bicolor*

Extrator	m/v (g/mL)	Tempo de Extração (minutos)
Cloreto de Sódio 0,15 M	10 g / 100 mL	60
Sulfato de amônio 1M	10 g / 100 mL	30
Glicina 0,1 M pH 2,6	10 g / 100 mL	30
Fosfato de sódio 0,5 M pH 6,0	10 g / 100 mL	30
Fosfato de sódio 0,5 M pH 8,0	10 g / 100 mL	30
Acetato de sódio 0,2 M pH 4,0	10 g / 100 mL	30
Cloreto de sódio 0,15 M	10 g / 100 mL	1440
Glicina 0,1 M + Cloreto de Sódio 0,15 M pH 2,6	10 g / 100 mL	30
Acetato de Sódio 0,1 M + Cloreto de Sódio 0,15 M pH 6,0	10 g / 100 mL	30
Acetato de Amônio 0,01 M pH 4,9	10 g / 100 mL	60
Tris- HCl 0,1 M + Cloreto de Sódio 0,15 M pH 7,4	10 g / 100 mL	60
Cloreto de Sódio 0,15 M + Cloreto de Potássio 3 Mm pH 7,2	10 g / 100 mL	30
Fosfato de Sódio 1 M pH 7,8	10 g / 100 mL	30
Acetato de Sódio 0,1 M + Cloreto de Sódio 0,15 M pH 6,0	10 g / 100 mL	30
Acetato de Sódio 0,1 M + Cloreto de Sódio 0,15 M pH 4,0	10 g / 100 mL	60

3. Resultados e Discussão

Inicialmente, foi feita a extração salina com NaCl 0,15 M e glicina 0,1 M pH 2,6. Com o intuito de visualizar o perfil proteico do extrato total das cascas de sementes de *Dioclea bicolor* procedeu-se uma eletroforese em gel de SDS PAGE, onde foi possível apenas visualizar bandas proteicas na amostra extraída com Glicina 0,1 M (Figura 1). No teste de AHE foi possível visualizar a não atividade hemaglutinante tanto das amostras extraídas com NaCl 0,15 M, como nas amostras extraídas com glicina 0,1 M pH= 2,6 (Figura 2).

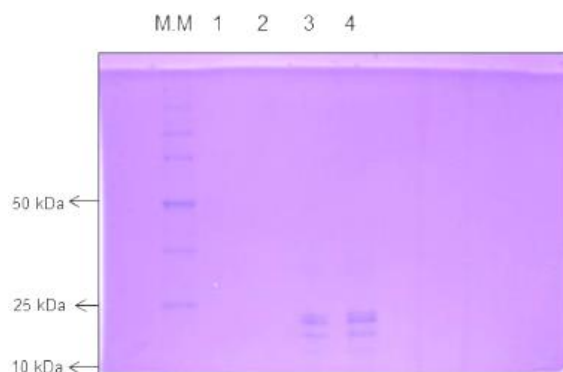


Figura 1. Eletroforese em SDS-PAGE em condições redutoras (M.M: Marcador molecular Promega; 1 e 2: Amostras extraídas com NaCl 0,15 M; 3 e 4: Amostras extraídas com glicina 0,1M pH 2,6).

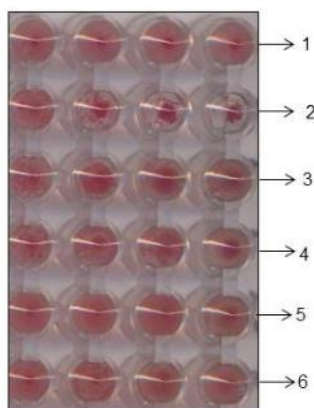


Figura 2. Ensaio AHE das amostras: 1. Controle negativo; 2: Controle positivo; 3 e 4: Amostras extraídas com NaCl 0,15 M; 5 e 6: Amostras extraídas com glicina 0,1 M pH 2,6. A atividade foi determinada utilizando eritrócitos de coelho a 2% v/v.

A fim de se obter extratos proteicos de melhor qualidade outras formas de extrações foram selecionadas: sulfato de amônio 1M, fosfato de sódio 0,5 M pH 6, fosfato de sódio 0,5 M pH 8, glicina 0,1 M + cloreto de sódio 0,15 M pH 2,6, acetato de sódio 0,1 M + cloreto de sódio 0,15 M pH 6, acetato de amônio 0,01 M pH 4,9, tris- HCl 0,1 M + cloreto de sódio 0,15 M pH 7,4, cloreto de sódio 0,15 M + cloreto de potássio 3 Mm pH 7,2, fosfato de Sódio 1 M pH 7,8, acetato de sódio 0,1 M + cloreto de sódio 0,15 M pH 6, e acetato de sódio 0,1 M + cloreto de sódio 0,15 M pH 4,0.

Após todas as extrações procedeu-se uma eletroforese em gel de SDS PAGE, onde foi possível apenas visualizar bandas proteicas nas amostras extraídas com acetato de sódio 0,025 M + cloreto de sódio 0,1 M pH 4,9 e acetato de amônio 0,01 M pH 4,9 (Figura 3). O teste de AHE foi realizado para esses novos extratos e novamente não foi visualizada a atividade hemaglutinante (Figura 4).

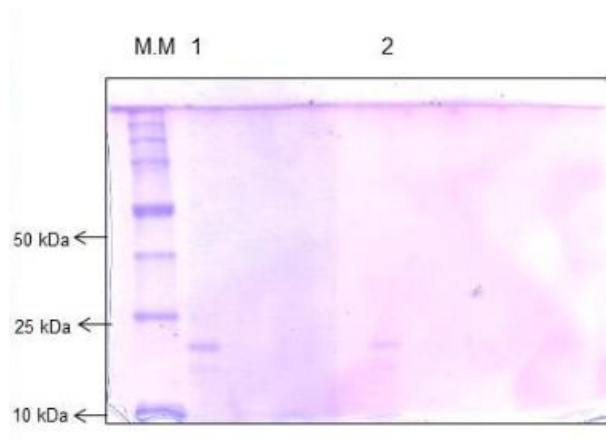


Figura 3. Eletroforese em SDS-PAGE em condições redutoras (M.M: Marcador molecular Promega; 1: Amostra extraída com acetato de amônio 0,01 M pH 4,9; 2: Amostra extraída com acetato de sódio 0,025 M + cloreto de sódio 0,1 M pH 4,9).

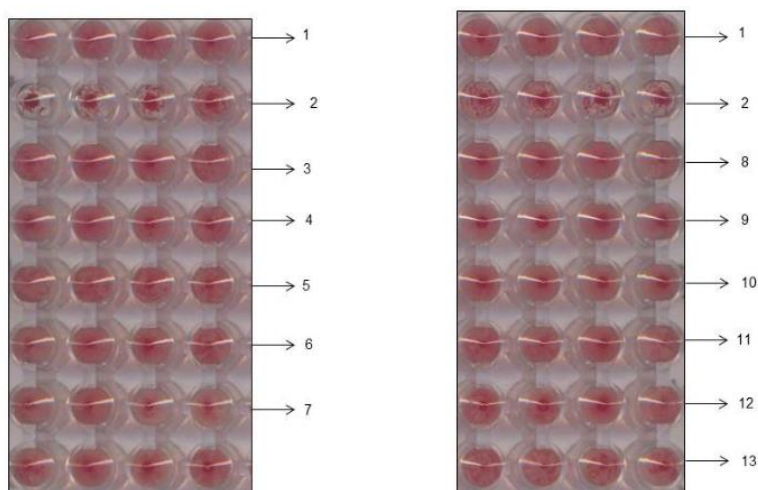


Figura 4. Ensaio da AHE das amostras: 1. Controle Negativo; 2. Controle positivo; 3. Sulfato de amônio 1M; 4. Fosfato de sódio 0,5 M pH 6; 5. Fosfato de sódio 0,5 M pH 8; 6. Glicina 0,1 M + cloreto de sódio 0,15 M pH 2,6; 7. Acetato de sódio 0,1 M + cloreto de sódio 0,15 M pH 6; 8. Acetato de amônio 0,01 M pH 4,9; 9. Tris- HCl 0,1 M + cloreto de sódio 0,15 M pH 7,4; 10. Cloreto de sódio 0,15 M + cloreto de potássio 3 Mm pH 7,2; 11. Fosfato de Sódio 1 M pH 7,8; 12. Acetato de sódio 0,1 M + cloreto de sódio 0,15 M pH 6; 13. Acetato de sódio 0,1 M + cloreto de sódio 0,15 M pH 4,0. A atividade foi determinada utilizando eritrócitos de coelho a 2% (v/v).

A casca da semente é um importante tecido para manter a integridade da semente e também a primeira barreira encontrada pelos patógenos e com isso têm sido relatado nas cascas de sementes a presença de proteínas que ajudam na proteção da semente como ocorre no trabalho de Santos *et al.* (2008); onde proteínas presentes na casca da semente de *Glycine max* (Família Fabaceae) apresentaram propriedade fungicida. Fernandes *et al.* (2011) identificaram a presença de lectinas no cotilédone da semente de *Dioclea bicolor*.

4. Conclusão

Os extratos proteicos obtidos de diferentes extrações da casca da semente de *Dioclea bicolor* não apresentaram atividade hemaglutinante. Esses mesmos extratos proteicos quando submetidos a eletroforese em SDS-PAGE em condições redutoras não apresentaram bandas proteicas aparente, exceto para os extratos proteicos obtidos com glicina 0,1 M pH 2,6, acetato de amônio 0,01 M pH 4,9 e acetato de sódio 0,025 M com cloreto de sódio 0,1 M pH 4,9 que exibiram bandas proteicas aparentes. Mesmo sendo a casca da semente a primeira barreira de defesa vegetal, a casca das sementes de *Dioclea bicolor* deve estar mais relacionada a defesa física do que a defesa química contra fitopatógenos.

5. Referências Bibliográficas

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Cavalcanti, T.T.A.; Rocha, B.A.M; Carneiro, V.A.; Arruda, F.V.S; Nascimento, A.S.M.; Sá, N.C.; Nascimento K.S.; Cavada, B.C., Texeira, E.H. 2011. Effect of lectins from Diocleinae Subtribe against *Streptococci*. *Molecules*, 16: 3530-3543.
- Dash, K.P. 2013. Isolation, purification and partial characterization of a lectin protein from the seeds of green seeded chickpea PUSA *hara chana* (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, In press.
- Fernandes, A.V.; Ramos, M.V.; Gonçalves, J.F.C.; Maranhão, P.A.C.; Chevreuil, L.R.; Souza, L.A. 2011. Seeds of Amazonian Fabaceae as a source of new lectins. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23: 237-244.
- Fernandes, A.V.; Ramos, Ramos, M.V.; Vasconcelos, I.M.; Moreira, A.C.; Moreno, F.B.; Pereira, J.O.; Gonçalves, J.F.C.;2012. Purification and Characterization of a lectin of the Swartzieae Legume Taxa. *Protein and Peptide Letters*, 19: 1082-1088.
- Gatehouse, A.M.R.; Powell, K.S; Peumans, W.J.; Van Damme, E.J.M; Gatehouse, J.A.; 1995. Insecticidal properties of plants lectins: their potential in plant protection. *Biomedical Perspectives*, 35-37.
- Lima, H.S.; Santana, A.A.; Souza, N.S.; Rosa, I.G. 2013. Plant lectins: an exploration of the species *Artocarpus integrifolia* L. *Acta Braizlian Science*, 1: 13-30.
- Santos, P.O; Santos, I.S; Gomes, V.M.; Machado, O.L.T; Fernandes, K.V.S; Xavier, J.A.; Oliveira, A.E.A. 2008. In vitro evaluation of antifungal activity of soybean (*Glycine max*) seed coat proteins. *Journal of Stored Products Research*, 44: 310-315
- Rüdiger, H.; Gabius, H.J. 2001. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate Journal*, 18:589-613.