

ESTUDO DA PRESENÇA DE LECTINA(S) EM SEMENTES DE *Copaifera reticulata* E *Pentaclethra maculosa*

Bianca Caroline Carvalho CAMPOS¹

Andreia Varmes FERNANDES²

Paulo Abráao Cavalcante MARANHÃO³

José Francisco de Carvalho GONÇALVES³

¹Bolsista Iniciação Científica INPA-PIBIC/CNPq;

²Orientador CDAM/INPA²; ³Colaborador CDAM/INPA.

INTRODUÇÃO

O bioma amazônico é rico em diversidade, um hectare de sua floresta pode comportar mais de 670 espécies arbóreas (Silva *et al.* 2014). A exploração de toda essa diversidade é dada basicamente pela indústria madeireira, com isso a floresta tem sido bastante devastada, entretanto formas menos invasivas de exploração estão sendo estudadas e aplicadas, como o isolamento de moléculas bioativas, dentre essas moléculas há um grupo de proteínas, as lectinas (Fernandes *et al.* 2011). Lectinas são glicoproteínas de origem não-imunológica, que se ligam de forma reversível e especificamente a determinados carboidratos. Esta habilidade de reconhecimento entre proteínas e carboidratos é fundamental em muitos processos biológicos, como infecções virais, bacterianas e, ainda, na marcação de células e componentes solúveis, fertilização, metástases cancerígenas e no crescimento e diferenciação celular (Farias 2013). No reino vegetal, as lectinas mais bem estudadas são encontradas nas sementes de espécies da família Fabaceae.

De acordo com a literatura, as lectinas dessa família possuem diversas aplicações biotecnológicas e, conseqüentemente, um grande valor econômico, por exemplo: a lectina isolada das sementes de *Canavalia ensiformes*, *Canavalia brasiliensis* que apresenta um potencial citotóxico (Martins 2009). As funções de lectinas em plantas ainda não estão definidas, porém os dados apresentados até então indicam que as mesmas podem participar da função de defesa vegetal. A habilidade que as lectinas de plantas têm de interagir com carboidratos expostos na superfície celular de micróbios, resultou no emprego dessas biomoléculas como sondas diagnósticas para identificação de bactérias patogênicas, que estão baseadas na reação de aglutinação seletiva entre lectina e bactéria (Doyle e Slifkin 1994). Considerando a importância do conhecimento bioquímico, do valor econômico agregado as lectinas isoladas de sementes de Fabaceae é visível a importância da identificação e o isolamento de novas lectinas. Neste estudo, buscam-se novas lectinas nas espécies de *Copaifera reticulata* e *Pentaclethra maculosa*, pertencentes à família Fabaceae, a demais um valor econômico agregado apenas aos seus óleos que são aplicados nas indústrias de cosméticos, ou de uso popular como cicatrizantes.

Este estudo teve como objetivo avaliar a presença de lectina(s) do extrato proteico das espécies *Copaifera reticulata* e *Pentaclethra maculosa*, bem como isolar suas lectinas a partir de colunas cromatográficas e testar sua atividade contra fungos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção do extrato protéico as sementes de *C. reticulata* e *P. maculosa* foram trituradas em moinho analítico de facas até a obtenção de um material finamente pulverizado, o qual foi submetido à homogeneização em solução de NaCl 0,15 M, sob leve agitação durante 2h a 4 °C. Em seguida, procedeu-se a centrifugação do material nas seguintes condições: 11.000 x g, durante 20 min a 10 °C. Os sobrenadantes

foram dialisados contra água destilada, durante 72 horas a 4 °C e, posteriormente liofilizados, para obtenção de uma massa totalmente seca.

Quanto à tentativa de purificação parcial das proteínas, realizou-se a cromatografia de troca iônica, os extratos proteicos de *C. reticulata* e *P. macroloba* foram aplicados em uma coluna de troca aniônica DEAE – Sepharose Fast Flow (GE Healthcare). O tampão de equilíbrio utilizado foi o Tris-HCl 0,05 M com pH 8,0. Os extratos proteicos (10 mg / mL em Tris-HCl 0,05 M pH 8,0) foram aplicados na coluna (11cm x 1,5cm) um por vez, sendo coletadas frações de 2,0 mL em microtubos a cada minuto. As eluições foram realizadas em gradiente salino utilizando os tampões Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 contendo NaCl 0,1 M; 0,5 M e NaCl 1 M. O monitoramento do perfil cromatográfico, para ambas cromatografias foi realizado por leituras espectrofotométricas no comprimento de onda igual à 280nm. Nas frações correspondentes a cada pico foram realizados ensaios de hemaglutinação. Realizou-se posteriormente outro método cromatográfico por exclusão molecular, a coluna utilizada foi a PD-10, aplicou-se os extratos de cada amostra diluído 10 mg do extrato liofilizado em 5 mL de tampão Tris-HCl 20 mM de pH 7,6. Este mesmo tampão foi passado 5 vezes o volume da coluna para equilibrá-la. Coletou-se as frações de 2 mL em 25 microtubos, e depois lavou-se a coluna em 5x o seu volume com o tampão Tris-HCl 20 mM de pH 7,6.

Após a obtenção das frações cromatográficas por exclusão molecular, as amostras foram quantificadas pelo método de Bradford. Realizou-se uma curva padrão com a proteína BSA, com sete tubos. No primeiro tubo, o branco, foi adicionado 3 mL do reagente de Bradford e 100 µL de H₂O destilada. Nos seis tubos restantes adicionou-se também 3 mL do reagente porém aplicou-se as respectivas concentrações de BSA nos tubos: 1(10 µL), 2(20 µL), 3(40 µL), 4(60 µL), 5(80 µL) e 6(120 µL). Após 10 min, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm. Com as amostras de *C. reticulata* e *P. macroloba* (obtida da cromatografia por exclusão molecular), realizou-se a quantificação em duplicata com cada amostra, 3 mL do reagente de Bradford em cada tudo, e foi-se acrescentado 100 µL de cada amostra em tubos diferentes, e depois de 10 minutos foi lida a absorbância a 540nm.

A identificação de lectinas nos extratos proteicos e nas frações cromatográficas das espécies em estudo foi realizada pelo ensaio de atividade hemaglutinante (AHE). Esse ensaio foi iniciado com a preparação dos eritrócitos. Desta forma, as amostras de sangue de coelho usadas no estudo foram coletadas e imediatamente homogeneizadas em heparina (2 gotas/mL). Os eritrócitos foram lavados a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C por três vezes com solução salina (NaCl 0,15M). O precipitado foi ressuscitado na mesma solução de modo a obter uma suspensão final de eritrócitos a 2% v/v. Com a solução de eritrócitos pronta pode-se iniciar o ensaio de AHE, onde foi realizado por diluição seriada em placas de microtitulação contendo 8 fileiras de 12 poços cada. Para cada fileira, no primeiro poço são adicionados 25 µL de NaCl 0,15 M, 25µL da amostra do extrato proteico. Nos demais se fez a diluição seriada até o último poço. Por último, foram adicionados em cada poço 25 µL da solução de eritrócitos 2% v/v. As placas foram, então, incubadas durante 30 min a 37 °C em câmara de temperatura controlada e os resultados foram analisados a olho nu após 30 min, em temperatura ambiente. A visualização da rede de hemaglutinação é possível pela formação da hemaglutinação dos eritrócitos que indica a presença de lectinas, por outro lado, a provável ausência de lectinas é visto pela formação precipitado dos eritrócitos.

Para a obtenção do perfil protéico das amostras obtidas nas cromatografias, foram preparados géis de poliacrilamida (SDS – PAGE), onde os géis de concentração e separação foram obtidos a partir de uma solução estoque de acrilamida a 30% p/v e de N-N'-metilenobis-acrilamida 0,8% p/v (Laemmli 1970). O gel

de concentração 5% p/v foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, e o gel de separação 12,5% p/v, em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, sendo acrescentado em ambos SDS 20% p/v. A polimerização foi conseguida pela adição de TEMED e PSA 10% p/v. As amostras proteicas (10–20 µg) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,0, contendo 1% p/v de SDS, 10% v/v de glicerol e 1% v/v de β-mercaptoetanol e, posteriormente, imersas em água em ebulição durante 10 minutos. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris-HCl 0,025M, glicina 0,192M e SDS 0,1%, a 120 volts, 15 mA, durante 2 h. Os marcadores de massas moleculares da Promega (10 kDa - 220 kDa) foram utilizados. Após a eletroforese, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue com ácido acético 0,1% v/v, metanol e água deionizada na proporção de 1:4:5 durante 2 horas e então, descorados em solução de ácido acético glacial, metanol e água deionizada na proporção de 1:4:5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos proteicos brutos de *C. reticulata* e *P. macroloba* não apresentaram atividade hemaglutinante. Esse fato pode ser atribuído à qualidade, ao tempo de coleta e ao armazenamento do sangue de coelho utilizado. A desnaturação das proteínas dos extratos utilizados também pode ter ocasionado tais resultados, considerando que condições no decorrer do experimento (temperatura, pH) podem resultar em variáveis alterações na estrutura das proteína de interesse. Possivelmente, a presença de saponina na espécie *P. macroloba* (Santiago 2005), pode resultar na hemólise das células, ocasionando um resultado falso negativo, pois não se pode afirmar, com clareza, se há presença de lectinas nas amostras, pois os eritrócitos não permaneceram íntegros durante o ensaio.

No fracionamento proteico dos extratos de *C. reticulata* e *P. macroloba*, foi realizado cromatografia de troca aniônica em resina de DEAE-Sepharose. Os cromatogramas abaixo (Figuras 1 e 2) evidenciam as frações eluídas pelas diferentes concentrações das soluções salinas. Com as amostras obtidas da reunião das frações de cada pico cromatográfico, realizou-se teste de AHE, porém não se observou nenhuma rede de eritrócitos com as frações tanto de *C. reticulata* e *P. macroloba*. Este resultado pode estar associado à baixa concentração de lectinas no extrato proteico, ou até mesmo pela baixa afinidade das lectinas pela resina testada neste primeiro momento.

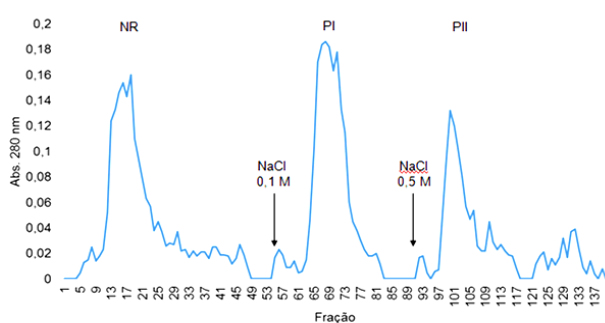


Figura 1. Perfil cromatográfico do extrato proteico da semente de *P. macroloba* submetido à DEAE-Sepharose. Para a análise, 10 mL da amostra (10 mg/mL) foi aplicada em uma coluna (20 mL) contendo a resina pré-equilibrada com Tris-HCl 50 mM pH 8,0. O pico não retido (NR) foi eluído da resina com o mesmo tampão. Enquanto os picos retidos, PI e PII, foram eluídos com Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo, respectivamente, NaCl 0,1 M e NaCl 0,5 M, como indicado nas setas. As frações (2 mL) foram coletadas a um fluxo de 0,5 mL/min e monitoradas por leituras espectrofotométricas a 280nm.

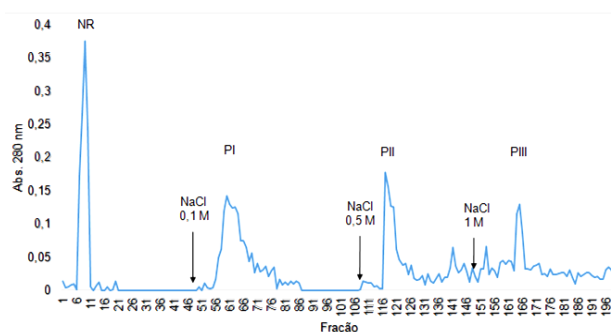


Figura 2. Perfil cromatográfico do extrato proteico da semente de *C. reticulata* submetido à DEAE-Sepharose. Para a análise, 10 mL da amostra (10 mg/mL) foi aplicada em uma coluna (20 mL) contendo a resina pré-equilibrada com Tris-HCl 50 mM pH 8,0. O pico não retido (NR) foi eluído da resina com o mesmo tampão. Enquanto os picos retidos, PI e PII, foram eluídos com Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo, respectivamente, NaCl 0,1 M e NaCl 0,5 M, como indicado nas setas. As frações (2 mL) foram coletadas a um fluxo de 0,5 mL/min e monitoradas por leituras espectrofotométricas a 280nm.

A análise do perfil proteico bruto das sementes das espécies de *C. reticulata* e *P. macroloba* foi realizada por SDS-PAGE (Figura 3). Entretanto, não se observou a banda proteica na faixa de massa molecular de interesse em torno de 25 a 30KDa.

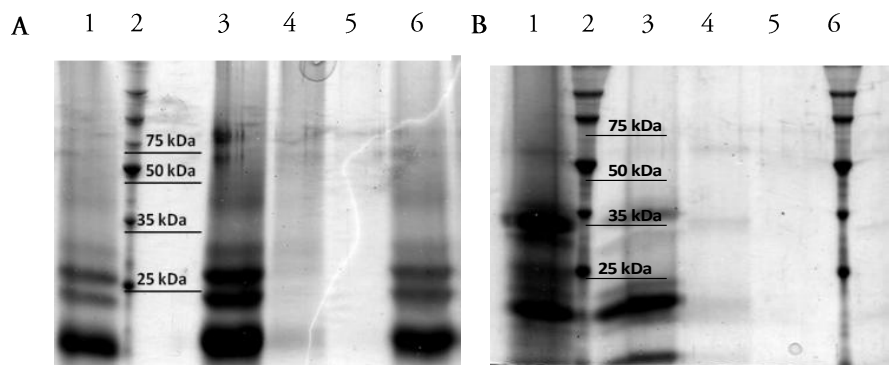


Figura 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). As amostras contidas no gel (A) são: extrato de *C. reticulata*(1), marcador PROMEGA(2), fração não retida de *C. reticulata*da cromatografia em resina DEAE-Sepharose(3), pico 1 da cromatografia em resina DEAE-Sepharose(4), pico 2 da cromatografia em resina DEAE-Sepharose(5), pico 3 da cromatografia em resina DEAE-Sepharose(6). As amostras contidas no gel (B) são: extrato de *P. macroloba*(1), marcador PROMEGA(2), fração não retida de *P. macroloba*da cromatografia em resina DEAE-Sepharose(3), pico 1 de *P. macroloba*da cromatografia em resina DEAE-Sepharose(4), pico 2 de *P. macroloba*da cromatografia em resina DEAE-Sepharose(5), pico 3 de *P. macroloba*da cromatografia em resina DEAE-Sepharose(6).

As frações correspondentes a cada um dos picos obtidos pela cromatografia de exclusão molecular (PD-10) das espécies em estudo foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12,5% para o monitoramento da cromatografia (figura 4). No poço 1 e 2 do gel, pode-se observar uma banda proteica próximo a 25 KDa, porém de baixa intensidade, pois o extrato contém um baixo teor proteico inferido pela quantificação de Bradford.

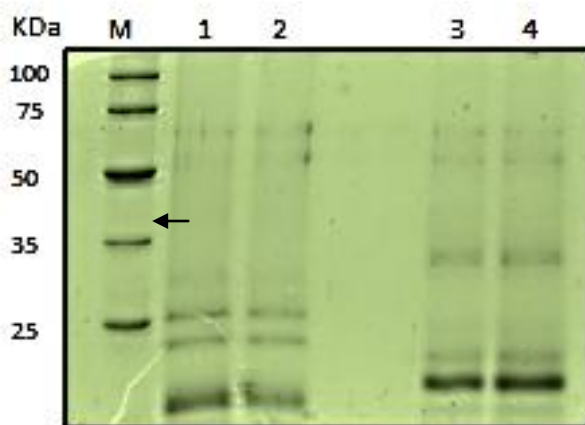


Figura 4. M: Marcador; 1-Frações da cromatografia *C. reticulata* (25 μ l); 2-Frações da cromatografia de *C. reticulata* (12,5 μ l); 3-Frações da cromatografia de *P. macroloba* (12,5 μ l); 4-Frações da cromatografia de *P. macroloba* (25 μ L).

A fim de testar o potencial antifúngico dos extratos de *C. reticulata* e *P. macroloba* realizou-se um teste de inibição do crescimento dos fungos demonstrados na Tabela 1, onde ocorreu um potencial de inibição interessante no extrato de *P. macroloba* sobre os fungos: *Alternaria sp.* no qual se observou uma inibição de crescimento de 60% e *Fusarium oxysporum*, que foi inibido mais de 67% do seu crescimento.

Tabela 1. Atividade antifúngica de extratos proteicos de sementes das espécies *C. reticulata* e *P. macroloba*, da Família Fabaceae, contra fungos fitopatogênicos.

| Fungos | <i>Copaifera reitulata</i> | <i>Pentaclethra macroloba</i> |
|------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| <i>Alternaria sp.</i> | 38,6 ± 9,8 | 60,3 ± 1,9 |
| <i>Aspergillus flavus</i> | - | - |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 12 ± 3,9 | 67,8 ± 10,75 |
| <i>Penicillium chrisogem</i> | - | - |

CONCLUSÃO

Considerando os resultados apresentados, pode-se concluir que possivelmente ocorre a presença de lectina no extrato de *C. reticulata* como visualizado em uma banda proteica com massa molecular em torno de 30 kDa, esse resultado demonstra pelo menos em parte, que o método cromatográfico por exclusão molecular mostrou-se eficiente. Para uma melhor definição quanto à presença de lectina é necessário a realização do teste de hemaglutinação (AHE). Porém, o sangue de coelho obtido para a realização da AHE não se encontrava em condições de concentração de eritrócitos mínimas necessárias para que fosse possível inferir quanto à presença de lectinas nos extratos de *C. reticulata* e de *P. macroloba*. A relação do potencial de inibição do crescimento fúngico evidenciado para o extrato de *P. macroloba* quanto à presença de proteínas deverá ser investigada.

REFERÊNCIAS

- Silva, W.A.S.; Carim, M.D.J.V.; da Silva Guimarães, J.R.; Tostes, L.D.C.L. 2014. Composição e diversidade florística em um trecho de floresta de terra firme no sudoeste do estado do Amapá, Amazônia oriental, Brasil. *Biota Amazônia (Biota Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)*, 4(3): 31-36.
- Doyle, R.J.; Slifkin, M. 1994. *Lectin-Microorganism Interactions*. New York: Marcel Decker, Inc.
- Farias, D.L. 2013. *Isolamento, Purificação e Atividades Biológicas de uma nova lectina de feijão praia, Canavalia maritima*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba. 16p.
- Fernandes, A.V.; Ramos, M.V.; Vasconcelos, I.M.; Moreira, A.C.O.M.; Moreno, F.B.; Gonçalves, J.F.C. 2011. Purification and characterization of a lectin of the swartzieae legume taxa. *Protein and Peptide Letters*, 19(10): 1082-1088.
- Martins, F.V.C. 2009. *Avaliação do Potencial Citotóxico de Lectinas de Canavalia ensiformis, Canavalia brasiliensis e Cratylia floribunda*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba. 125p.
- Santiago, G.M.P.; Viana, F.A.; Pessoa, O.D.L.; Santos, R.P.; Pouliquen, Y.B.M.; Arriaga, A.M.C.; Andrade-Neto, M.; Braz-Filho, R. et al. 2005. Avaliação da atividade larvicida de saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (Fabaceae) e *Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae) sobre *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(3): 187-190.