

## ESTUDO DA PRESENÇA DE LECTINAS EM SEMENTES DE ESPÉCIES DE FABACEAE DA AMAZÔNIA

Alexandre Felipe Santa Ana de LIMA<sup>1</sup>  
Andreia Varmes FERNANDES<sup>2</sup>  
José Francisco de Carvalho GONÇALVES<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista de Iniciação Científica do INPA; <sup>2</sup>Orientador CDAM/INPA; <sup>3</sup>Co-orientador CDAM/INPA

### INTRODUÇÃO

A investigação de biomoléculas em espécies de plantas da família Fabaceae na floresta Amazônica visa prospectar economicamente a biodiversidade por meio de pesquisas sobre os potenciais dessa vegetação devido a sua diversidade de espécies (Souza 2012). As sementes pertencentes à família Fabaceae possuem um alto teor proteico, dentre essas as lectinas, que são proteínas ou glicoproteínas com pelo menos um domínio não catalítico de ligação reversível e especificamente a monossacarídeos e oligossacarídeos. As lectinas ligam-se às porções de carboidratos presentes nas superfícies das células, participando de vários processos celulares sem alterar as propriedades dos carboidratos envolvidos (Nóbrega *et al.* 2012; Teixeira *et al.* 2014).

As lectinas de leguminosas são as mais bem estudadas e caracterizadas, podendo ser encontrada em toda a planta, porém se acumulam, principalmente, nas sementes, onde o teor total de proteínas solúveis presentes nesse tecido de reserva pode representar até 15% do conteúdo total de proteínas (Oliveira *et al.* 2002; Nasi *et al.* 2009; Lam e Ng 2011). Por sua característica única de ligação a carboidratos, as lectinas têm aplicações bastante amplas, dentre as quais podem ser destacadas: identificação da presença de carboidratos em biopolímeros ou glicoconjugados; a cromatografia de afinidade para o isolamento de hormônios, neurotransmissores, imunoglobulinas e compostos relacionados; os estudos relacionados à estrutura química de membranas biológicas; podem contribuir para o esclarecimento das alterações estruturais dos carboidratos de superfície celulares nas transformações malignas; na identificação de células tumorais e no emprego da microbiologia e da parasitologia como instrumento para o reconhecimento celular e diagnóstico (Filho 2013).

As propriedades hemaglutinantes das lectinas podem ser avaliadas por meio do teste de atividade hemaglutinante com eritrócitos sanguíneos de diferentes animais, onde há a formação de um malha de eritrócitos. Em um estudo sobre bioprospecção de lectinas em sementes de espécies da família Fabaceae foram analisadas cinquenta espécies nativas da Amazônia e foram encontrados sete extratos proteicos com potencial para atividade hemaglutinante (Fernandes *et al.* 2011). Esse estudo apresentou um número reduzido de espécies com atividade hemaglutinante, nas condições testadas. Desta forma, uma alternativa para se estudar as mesmas espécies em condições diferentes pode ser a escolha do tratamento dos eritrócitos com tripsina antes do ensaio da atividade hemaglutinante (AHE). A tripsina é uma enzima que catalisa a hidrólise de ligações peptídicas de moléculas proteicas presentes na membrana plasmática dos eritrócitos e pode, dessa forma, eliminar estruturas mais abundantes e permitir a exposição de açúcares anteriormente menos acessíveis. Esta nova exposição poderá facilitar a interação de uma lectina presente no extrato com receptores agora acessíveis (Fernandes 2009).

O ensaio de inibição da AHE permite inferir sobre a especificidade da lectina ao carboidrato, quando se incuba o extrato proteico com diferentes açúcares.

Este estudo visa identificar lectina(s) que podem estar presentes nos extratos proteicos de cinquenta espécies, porém não visualizadas anteriormente, afim de, posteriormente, isolar e caracterizar essas proteínas bioquimicamente e biologicamente.

### MATERIAL E MÉTODOS

Para a extração proteica de sementes de cinquenta espécies da família Fabaceae, oriundas do banco de sementes do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (LFBV), INPA – Campus III, as sementes foram trituradas em moinho analítico de facas até a obtenção de um material finamente pulverizado. Em seguida, o material foi homogeneizado em solução salina de NaCl 0,15 M 10% p/v. As suspensões foram mantidas sob leve agitação durante 2 horas, a temperatura ambiente e posteriormente centrifugada a 11.000 x g durante 20 minutos a 10 °C. Os precipitados foram descartados e os sobrenadantes foram dialisados contra água destilada durante 72 horas a 4 °C, com trocas de água a cada 4 horas e depois liofilizados até a obtenção de uma massa seca total. A estimativa da concentração proteica nos extratos foi feita utilizando a metodologia de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

Para o ensaio de hemaglutinação os eritrócitos de coelho foram tratados com tripsina. Amostras de 3 mL de sangue obtidas de um coelho jovem, proveniente do Biotério Central do INPA – Campus I, foram coletadas e homogeneizadas com 30 µL de heparina (Bergamo). O sangue foi transportado para o LFBV e lavado com NaCl 0,15 M a 3.000 rpm, 10

minutos, a 10°C e descartado o sobrenadante. Esse processo de lavagem do sangue foi realizado três vezes. O precipitado foi ressuspenso em NaCl 0,15 M, obtendo uma suspensão final de eritrócitos a 2% v/v (Moreira e Cavada 1984). Foram adicionadas 2 mg de tripsina ao sangue lavado e deixado uma hora na mesa oscilante (TE-143, Tecnal, Br) sob leve agitação. A suspensão foi lavada seis vezes com NaCl 0,15 M gelado para que a enzima fosse eliminada. O volume foi ajustado ao final para corresponder a 2% v/v de eritrócitos de coelho tratados com tripsina.

A determinação da atividade hemaglutinante (AHE) com sangue tripsinizado foi feita pelo método de diluição seriada em placas de microtitulação contendo 8 fileiras de 12 poços. Inicialmente, a cada um dos poços adicionou-se 25 µL da solução salina (NaCl 0,15 M), em seguida 25 µL da amostra (extrato protéico na concentração 5 mg / mL em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 contendo de NaCl 0,15 M) no primeiro poço e, nos demais seguiu-se com a diluição seriada até o último poço, por último foram adicionados em cada poço 25 µL da suspensão de eritrócitos 2% v/v tratados com tripsina. Posteriormente, as placas foram incubadas durante 30 minutos a 37 °C e os resultados foram analisados a olho nu após 30 minutos a temperatura ambiente e, 12 horas após o período de incubação.

A inibição da AHE por diferentes açúcares (D-lactose, D-manose, D-galactose, D-glicose, D-frutose, D-maltose) foi examinada pela adição de açúcares numa concentração final de 0,1 M e incubadas. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços com volume final de 75 µL por poço, sendo 25 µL de uma diluição dupla seriada do açúcar a ser testado, 25 µL do extrato incubado durante 30 minutos a 37 °C em câmara de temperatura controlada (Eletro Lab) com posterior adição de 25 µL de uma suspensão a 2% v/v de eritrócitos de coelho tratado com tripsina. As placas foram incubadas por mais 30 minutos a 37 °C e a inibição da hemaglutinação foram avaliadas visualmente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A AHE foi determinada para cinquenta espécies (Tabela 1), utilizando sangue de coelho tratado com tripsina.

Tabela 1. Determinação da AHE de cinquenta espécies pertencentes da família Fabaceae, com eritrócitos de coelho tratados com tripsina e na concentração 2% (v/v).

Caesalpinioideae / Tribo	Mimosoideae / Tribo	Faboideae / Tribo
<i>Campsiandra laurifolia</i> / Caesalpinieae	<i>Anadenanthera peregrina</i> / Mimoseae	<b>*<i>Canavalia brasiliensis</i> / Phaseoleae</b>
<b>*<i>Cassia grandis</i> / Cassieae</b>	<i>Dinizia excelsa</i> / Mimoseae	<i>Centrosema plumieri</i> / Phaseoleae
<i>Cassia leiandra</i> / Cassieae	<i>Entada polyphylla</i> / Mimoseae	<b>*<i>Centrosema triquetrum</i> / Phaseoleae</b>
<i>Copaifera venezuela</i> / Detarieae	<i>Macrosamanea spruceana</i> / Ingeae	<i>Dalbergia spruceana</i> / Dalbergieae
<i>Crudia oblonga</i> / Detarieae	<i>Inga pezizifera</i> / Ingeae	<i>Dioclea bicolor</i> / Phaseoleae
<i>Cynometra bauhiniifolia</i> / Detarieae	<i>Parkia decussata</i> / Parkieae	<b>*<i>Mucuna urens</i> / Phaseoleae</b>
<i>Dialium guianense</i> / Cassieae	<i>Parkia gigantocarpa</i> / Parkieae	<i>Ormosia costulata</i> / Sophoreae
<b>*<i>Dicorynia paraensis</i> / Cassieae</b>	<i>Parkia multijuga</i> / Parkieae	<i>Ormosia discolor</i> / Sophoreae
<i>Dimorphandra caudata</i> / Caesalpinieae	<i>Parkia nitida</i> / Parkieae	<i>Ormosia grossa</i> / Sophoreae
<i>Hymenaea courbaril</i> / Detarieae	<i>Parkia panurensis</i> / Parkieae	<i>Ormosia lignivalvis</i> / Sophoreae
<i>Caesalpinia ferrea</i> / Caesalpinieae	<b>*<i>Parkia pendula</i> / Mimoseae</b>	<i>Ormosia macrocalyx</i> / Sophoreae
<i>Macrolobium multijugum</i> / Detarieae	<i>Stryphnodendron guianensis</i> / Mimoseae	<i>Ormosia parensis</i> / Sophoreae
<i>Peltogyne paniculata</i> / Detarieae	<i>Zygia cauliflora</i> / Ingeae	<i>Ormosia smithii</i> / Sophoreae
<i>Senna tapajozensis</i> / Cassieae	<i>Zygia inaequalis</i> / Ingeae	<i>Swartzia laevicarpa</i> / Swartzieae
<i>Tachigali hypoleuca</i> / Caesalpinieae	<i>Zygia trunciflora</i> / Ingeae	<i>Swartzia polyphylla</i> / Swartzieae
<b>*<i>Peltogyne catigae</i> / Amhertieae</b>		<i>Swartzia longistipitata</i> / Swartzieae
		<i>Swartzia pendula</i> / Swartzieae
		<i>Swartzia sericea</i> / Swartzieae
		<i>Swartzia ingifolia</i> / Swartzieae

\*Convencionou-se que as espécies destacadas em negrito apresentam AHE e as que não estão em destaque não apresentaram AHE.

A avaliação da hemaglutinação com o sangue tripsinizado possibilitou a visualização da AHE em mais 7 espécies. Porém, o número ainda reduzido de espécies exibindo AHE, pode ser devido ao único tipo de sangue utilizado. Desta forma, do total de 50 espécies (Tabela 1) temos agora 14 espécies da família Fabaceae exibindo AHE com eritrócitos de coelho.

## CONCLUSÃO

A expectativa pelo aumento no número de espécies exibindo AHE não foi atendida, haja vista que o estudo foi realizado com sementes de Fabaceae, considerada a maior fonte de proteínas solúveis na planta. Por outro lado, poderia-se ter submetido os extratos protéicos a outros tipos de sangue tratado com a tripsina, por exemplo, rato ou de peixe a fim de se poder afirmar sobre a presença de lectinas nessas espécies.

## REFERÊNCIAS

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal Biochemistry*, 72: 248-254.
- Fernandes, A.V.; Ramos, M.V.; Gonçalves, J.F.C.; Maranhão, P.A.C.; Larissa, R.C.; Luiz, A.G.S. 2011. Seeds of Amazon Fabaceae as a source of new lectins. *Brazilian Society of Plant Physiology*, 23: 237-244.
- Fernandes, H.P. 2009. Estudo das propriedades elétricas das hemácias utilizando pinça optica. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, São Paulo.
- Lam, S.K.; Ng, T.B. 2011. Lectins: production and practical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89: 45-55.
- Filho, V.S.; Pereira, W.J.; Fernandes, K.F.; Batista, K.A. 2013. Extração, purificação parcial e caracterização de lectinas de sementes de *Crotalaria juncea*. *Biotecnologia e Ciência*, 2: 12-24.
- Moreira, R.A.; Cavada, B.S. 1984. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterization and behavior during germination. *Biologia Plantarum*, 26: 113-120.
- Nasi, A.; Picariello, G.; Ferranti, P. 2009. Proteomic approaches to study structure, functions and toxicity of legume seeds lectins. Perspectives for the assessment of food quality and safety. *Journal of Proteomics*, 72: 527-538.
- Nóbrega, R.B.; Rocha, B.A.M.; Gadelha, C.A.A.; Gadelha, T.S.; Pires, A.F.; Assreuy, A.M.S.; Nascimento, K.S.; Nagano, C.S.; Sampaio, A.H.; Cavada, B.S.; Delatorre, P. 2012. Structure of Diocleavirgatalectin: Relations between carbohydrate binding site and nitric oxide production. *Biochimie*, 94: 579-924.
- Oliveira, J.T.; Melo, V.M.; Câmara, M.F.; Vasconcelos, I.M.; Beltramini, L.M.; Machado, O.L.; Gomes, V.M.; Pereira, S.P.; Fernandes, C.F.; Nunes, E.P.; Capistrano, G.G.; Monteiro-moreira, A.C. 2002. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonarylectin from *Luetzelburgia auriculata*. *Phytochemistry*, 61: 301-310.
- Souza, L.A.G. 2012. Guia da biodiversidade da fabaceae do Alto Rio Negro. 19 ed. Manaus, [s.n.]. 118 p.
- Teixeira, C.S.; Assreuy, A.M.S.; Osterne, V.J.S.; Amorim, R.M.F.; Brizenno, L.A.C.; Debray, H.; Nagano, C.S.; Delatorre, P.; Sampaio, A.H.; Rocha, B.A.M.; Cavada, B.S. 2014. Mannose-specific legume lectin from the seeds of *Dolichos lablab* (FRIL) stimulates inflammatory and hypernociceptive processes in mice. *Process Biochemistry*, 49: in press.