

## PURIFICAÇÃO DE LECTINA(S) EM SEMENTES DE *Deguelia scandens*

Aline Bastos Brilhante de SOUSA<sup>1</sup>  
Andreia Varmes FERNANDES<sup>2</sup>  
José Francisco de Carvalho GONÇALVES<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq; <sup>2</sup>Orientador CDAM/INPA; <sup>3</sup>Co-orientador CDAM/INPA

### INTRODUÇÃO

A Amazônia detém um dos maiores índices de biodiversidade do planeta, abrigando inúmeras espécies vegetais que apresentam um conjunto de informações genéticas, químicas e bioquímicas de interesse para as indústrias farmacêutica, cosmética, alimentícia e outras. A família Fabaceae possui muitas espécies arbóreas com potencial para exploração e bioprospecção de plantas silvestres, principalmente para busca de moléculas de interesse biotecnológico e/ou outros bioprodutos florestais não madeiráveis, podendo, ainda, confirmar a lógica de sustentabilidade (Fernandes *et al.* 2012).

As proteínas são moléculas que se destacam quanto à concentração, quando se fala de sementes de espécies da família Fabaceae (Gonçalves 2002). Entre essas, as lectinas são bastante estudadas, sendo a concanavalina A (Con A) uma lectina amplamente conhecida e utilizada em procedimentos bioquímicos e biotecnológicos (Soares *et al.* 2013). A Con A, assim como todas as lectinas, tem especificidade de ligação a carboidratos, fato que as tornam proteínas com características únicas (Lima *et al.* 2014).

Considerando a importância no que se refere aos estudos das lectinas na prospecção dessas proteínas em sementes de Fabaceae da Amazônia (Fernandes *et al.* 2011) e da potencial atividade biológica, esta pesquisa buscou identificar e isolar lectinas presentes em sementes da espécie *Deguelia scandens*.

### MATERIAL E MÉTODOS

As sementes da espécie *Deguelia scandens*, obtidas do banco de sementes do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (LFBV - Campus III), foram trituradas em moinho analítico. O material finalmente pulverizado foi homogeneizado em solução salina de NaCl 0,15 M (10% p/v) e mantido sob leve agitação a temperatura ambiente durante 2 horas. Após este período, a amostra foi centrifugada a 11.000 g, 20 minutos, 10 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi submetido à diálise contra água destilada durante 72 horas a 4 °C e liofilizado até a obtenção de uma massa totalmente seca. A estimativa da concentração proteica do extrato liofilizado foi feita utilizando a metodologia de Bradford (1976).

A atividade hemaglutinante (AHE) foi determinada pelo método de diluição seriada em placas de microtitulação, onde a amostra de sangue, proveniente do Biotério Central do INPA foi preparada de modo a obter uma suspensão final de eritrócitos a 2% v/v (Moreira e Cavada 1984).

Inicialmente, a cada um dos poços foi adicionado 25 µL da solução salina (NaCl 0,15 M), em seguida, 25 µL do extrato proteico (5 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6) no primeiro poço e nos demais seguiu-se de uma diluição seriada até o último poço. Por último, foram adicionados 25 µL da suspensão de eritrócitos de sangue de coelho a 2% v/v. A inibição da AHE foi determinada com as soluções 0,1 M dos seguintes açúcares: D-glicose, D-manose, N-acetil-D-glicosamina, maltose, D-galactose, α-lactose e N-acetil-D-galactosamina.

Para purificação da lectina, o extrato proteico foi ressuscitado na concentração 2,5 mg/mL com Tris-HCl 0,1 M (pH 7,6) contendo NaCl 0,15 M, CaCl<sub>2</sub> 5mM, MnCl<sub>2</sub> 5mM e aplicado em uma coluna cromatográfica contendo 25 mL da resina Sephadex G50 (SIGMA). Subsequentemente, o material retido foi eluído com a solução de glicose 0,1 M contendo NaCl 0,15 M. O monitoramento do perfil cromatográfico foi realizado por espectrofotometria no comprimento de onda de 280 nm. Nas frações correspondentes ao pico retido foi realizado o ensaio AHE. Para as frações com AHE foram reunidas e utilizadas na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para obtenção do perfil proteico e estimativa da massa molecular.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato obtido apresentou concentração proteica total estimada em 2,91 mg/mL. Este, quando submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), apresentou banda proteica evidenciada entre 35 e 25 KDa (Figura 1). Estudos realizados com outras espécies de Fabaceae mostram que sementes de *Luetzelburgia auriculata* e *Phaseolus coccineus* apresentam lectinas com massa molecular em torno de 29 KDa, confirmando o padrão de massa molecular para lectinas encontrada em *D. scandens* (Oliveira *et al.* 2002; Chen *et al.* 2008).

O extrato proteico de *Deguelia scandens*, inicialmente testado para a AHE, apresentou aglutinação dos eritrócitos de coelho 2% v/v (Figura 2), ou seja, ocorreu o indicativo da presença de lectina. Isto por que a interação da lectina com o carboidrato presente na superfície do eritrócito forma uma rede de hemaglutinação.

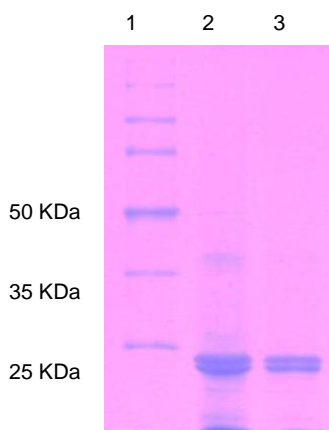


Figura 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Marcador de massa molecular (1). Extrato proteico de *Deguelia scandens* 0,15 mg e 0,0075mg (2) e (3), respectivamente.

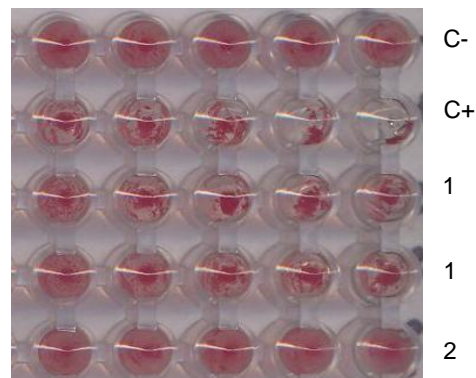


Figura 2. Ensaio da AHE do extrato proteico de *Deguelia scandens*, realizado com sangue de coelho a 2% v/v. C<sup>-</sup>: controle negativo. C<sup>+</sup>: controle positivo. (1) Extrato proteico de *Deguelia scandens*. (2) Extrato proteico de *D. scandens* aquecido até 100 °C.

Posteriormente, o extrato proteico de *D. scandens* foi submetido ao ensaio de inibição da AHE com sete diferentes açúcares (Figura 3). Neste ensaio, foi possível inferir sobre a especificidade da provável lectina presente no extrato proteico. Desta forma, pôde ser escolhida uma resina com um açúcar específico imobilizado. Na presença dos açúcares glicose, manose, N-acetil-glicosamina e maltose não houve hemaglutinação, concluindo que a lectina interagiu com o carboidrato adicionado e não com aquele presente na superfície do eritrócito. Já com os açúcares D-galactose, lactose e N-acetil-D-galactosamina houve hemaglutinação, concluindo que as lectinas do extrato interagiram com o carboidrato presente na superfície dos eritrócitos.

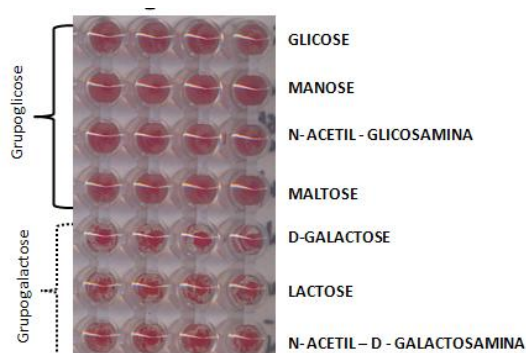


Figura 3. Ensaio da inibição da AHE, realizado com eritrócitos de coelho a 2% v/v. Açúcares do grupo glicose (glicose, manose, N-acetil-glicosamina e maltose) e do grupo galactose (D-galactose, lactose e N-acetil-D-galactosamina).

A fim de se purificar a provável lectina, o extrato proteico foi aplicado em coluna Sephadex G50 (SIGMA) e resultou em dois picos distintos, PI e PII (Figura 4).

Nas frações de absorbância máxima de cada pico foram realizados ensaios de AHE, onde se observou que nas frações correspondente ao pico I (PI) não apresentou aglutinação dos eritrócitos de coelho a 2%. As frações do pico II (PII) apresentaram AHE.

O perfil eletroforético do extrato proteico e das frações reunidas correspondentes ao PII, provenientes da cromatografia de afinidade (Sephadex G50), demonstra a purificação total da lectina, haja vista que há a presença de uma única banda proteica nas frações reunidas do PII (Figura 5). As frações reunidas do PII exibiram banda de aproximadamente 30 KDa, que correspondem possivelmente à classe das lectinas.

Estudos realizados com sementes de *Crotalaria juncea* isolaram parcialmente lectinas a partir de uma resina Sephadex G150, demonstrando, desta forma, a importância desta etapa cromatográfica para a purificação parcial ou total de lectinas (Filho *et al.* 2013).

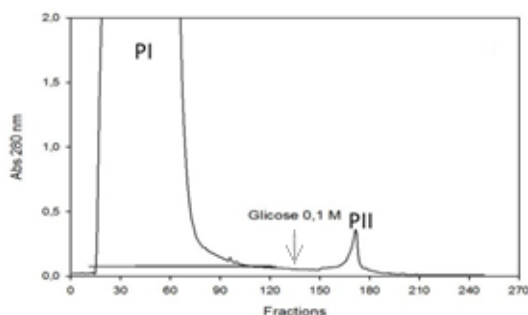


Figura 4. Cromatografia da afinidade (Sephadex G50 - SIGMA) do extrato proteico de *Deguelia scandens*. Para a análise, a amostra de 10 mg/mL foi previamente equilibrada com o tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M, MnCl<sub>2</sub> 5 mM e CaCl<sub>2</sub> 5 mM. O pico I (PI) foi eluído com o mesmo tampão ao passo que o pico II (PII) foi eluído com glicose 0,1 M. As frações de 2 mL cada, foram recolhidas e monitoradas espectrofotometricamente no comprimento de onda igual a 280 nm.



Figura 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) do extrato proteico de *Deguelia scandens* e da lectina purificada. Extrato proteico de *D. scandens* (1). Frações reunidas correspondentes ao PII da Sephadex G50 (2). Marcador de peso molecular da PROMEGA (KDa).

A especificidade da lectina purificada a partir do extrato proteico de *D. scandens*, foi testada contra os açúcares contidos na Tabela 1. Destes, manose, N-acetil-D-glicosamina, glicose,  $\alpha$ -metil-D-glicopiranoose, frutose, arabinose e sacarose, todos do grupo da glicose, apresentaram afinidade com a lectina.

Tabela 1. Inibição da atividade hemaglutinante da lectina isolada a partir do extrato proteico de *Deguelia scandens*. AHE realizada com suspensão de eritrócitos de coelho 2% v/v. Inibitória (+) e ausência de inibição (-).

Carboidratos	PII
N-acetil-D-galactosamina	-
$\alpha$ -lactose	-
D-galactose	-
$\beta$ -metil-D-galactopiranoose	-
$\alpha$ -metil-D-galactopiranoose	-
D-manose	+
N-acetil-D-glicosamina	+
D-glicose	+
$\alpha$ -metil-D-glicopiranoose	+
D-frutose	+
L-arabinose	+
Sacarose	+
Maltose	+

Para identificar a fração proteica isolada, obteve-se a sequência de aminoácidos N-terminal da lectina de *D. scandens* por degradação de Edman em sequenciador Shimadzu (Tabela 2) PPSQ-23A. Com a sequência de aminoácidos obtida, as semelhanças de sequências entre lectinas de espécies conhecidas foram identificadas com a ferramenta BLAST.

Tabela 2. Sequência de aminoácidos do N-terminal da lectina isolada de sementes de *Deguelia scandens* e sua homologia com outras sequências de aminoácidos de lectinas de plantas. As sequências sublinhadas referem-se aqueles que são encontrados nas cinco sequências a serem comparadas, não necessariamente na mesma posição.

Organismo	Sequência	Identificação (%)	E-value
<i>Deguelia scandens</i>	ADSV <u>S</u> FNFPDNYPRDQGNLIF <u>Q</u> GDA	-	-
<i>Pterocarpus angolensis</i>	DSL <u>S</u> FGFPTFPSPDQKNLIF <u>Q</u> GDA	68	10 <sup>-3</sup>
<i>Platypodium elegans</i>	DSL <u>S</u> FSFINFDRDERNLIF <u>Q</u> GDA	61	43x10 <sup>-3</sup>
<i>Lectin precursor (Sophora japônica)</i>	DSL <u>S</u> ETFNFGPDQRDLIL <u>Q</u> GDA	60	0,54
<i>Lotus tetragonolobus</i>	V <u>S</u> FN <del>Y</del> TRFKDDGSLIF <u>Q</u> GDA	54	0,74
<i>Ulex europaeus</i>	DDL <u>S</u> FNFDKFPVNQKNIIF <u>Q</u> GDA	58	1.0

## CONCLUSÃO

O extrato proteico da espécie *Deguelia scandens* promoveu a hemaglutinação dos eritrócitos de coelho, quando em ensaio da AHE, indicando a possível presença de lectina(s) no extrato. A partir do ensaio de inibição da AHE, conclui-se que essa lectina tem especificidade de interação com os açúcares glicose, manose, N-acetil-D-glicosamina e maltose. A purificação total da lectinas presente em sementes de *Deguelia scandens* se deu a partir da cromatografia de afinidade em coluna Sephadex G50 (SIGMA) e a confirmação da purificação veio por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e, posteriormente, pelo sequenciamento dos aminoácidos da extremidade do N-terminal com a comparação em banco de dados (NCBI). Esta lectina isolada de *Deguelia scandens* foi nomeada de DSL.

## REFERÊNCIAS

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- 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.
- 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.
- Filho, V.S.; Perreira, W.J.; Batista, K.A.; Fernandes, K.F. 2013. Extração, purificação parcial e caracterização de lectinas em sementes de *Crotalaria juncea*. *Revista de Biotecnologia & Ciência*, 2: 12-24.
- Gonçalves, J.F.C. 2002. Primary metabolism components of seeds from Brazilian Amazon tree species. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14: 139-142.
- Lima, H.S.; Santana, A.A.; Souza, N.S.; Rosa, I.G. 2014. Plant lectins: an exploration of the species *Artocarpus integrifolia* L. *Acta Brazilian Science*, 1: 13-30.
- Moreira, R.A.; Cavada, B.S. 1984. Lectin from *Canavalia brasiliensis* M.: Isolation, characterization and behavior during germination. *Biologia Plantarum*, 26: 113-120.
- 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.
- Soares, P.A.G.; Nascimento, C.O.; Porto, T.S.; Correia, M.T.S.; Porto, A.L.F.; Carneiro-da-Cunha, M.G. 2013. Purification of a lectins from *Canavalia ensiformis* using PEG-citrate aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography B*, 879: 457-460.