

## PURIFICAÇÃO DE LECTINA(S) EM SEMENTES DE *Swartzia laevis*

Paulo Abraão Cavalcante MARANHÃO<sup>1</sup>; José Francisco de Carvalho GONÇALVES<sup>2</sup>; Andreia Varmes FERNANDES<sup>3</sup>

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

### 1. Introdução

A bioprospecção de plantas silvestres da Amazônia em busca de medicamentos, moléculas de interesse agrícola e outros bioprodutos florestais não madeiráveis pode ajudar a resolver alguns dos desafios prementes da humanidade, dentre eles destaca-se a descoberta de moléculas que inibam o crescimento de fitopatógenos (Fernandes *et al.*, 2011). Nesse sentido, a família botânica Fabaceae (Leguminosae) representa uma potencial fonte de pesquisa, por possuir uma elevada concentração de moléculas N – derivadas, na qual se encontram as proteínas, que podem exercer processos de defesa contra fungos, vírus e bactérias (Pinto *et al.*, 2005). Diversos estudos científicos tem relacionado essa atividade biológica 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 leguminosas, correspondendo de 2 a 10% do conteúdo total de proteínas solúveis (Sharon, 1990; Rüdiger e Gabius, 2001). As lectinas das leguminosas constituem uma classe de proteínas capazes de aglutinar diferentes tipos de células, quando se ligam aos carboidratos que constituem o glicocálix da membrana celular de animais, de acordo com o grau de afinidade que apresentam. O único pré - requisito para uma proteína ou uma glicoproteína ser classificada como lectina, é que ela possua pelo menos um domínio não catalítico, que se liga reversivelmente a mono ou polissacarídeos específicos. (De Hoff *et al.*, 2009; Freitas *et al.*, 2011). Uma das potenciais aplicações biotecnológicas para as lectinas é sua ação como molécula natural contra fungos fitopatogênicos, como pode ser visto em diversos estudos, por exemplo, o relato de Melo *et al.* (2005); a lectina (LAA) das sementes de *Luetzelburgia auriculata*, ligante a D-galactose, conseguiu inibir o crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* e *Aspergillus niger*, ao adicioná-la no meio de cultura. Considerando essas informações, esse projeto de pesquisa teve como objetivo purificar e caracterizar a(s) lectina(s) de sementes de *Swartzia laevis*, popularmente conhecida como Saboarana, a fim de se obter uma molécula com potencial biotecnológico contra fungos fitopatogênicos, agregando valor à flora amazônica. E ainda, por meio dos resultados obtidos, contribuir para o entendimento das relações evolutivas de lectinas, de espécies leguminosas pertencentes à tribo Swartzieae, uma das tribos mais antigas da família Fabaceae.

### 2. Material e Métodos

As sementes inteiras e maduras, obtidas da Estação Experimental de Fruticultura Tropical (INPA) foram trituradas em moinho analítico de facas até obtenção de um material finamente pulverizado e, homogeneizado em solução salina de NaCl 0,15 M. A suspensão 10% p/v foi mantida sob leve agitação durante 2 horas e centrifugada a 11.000 x g durante 20 minutos a 10 °C. O sobrenadante foi dialisado contra água destilada durante 48 horas e, liofilizado. Então, com o extrato protéico em mãos, realizamos o ensaio de atividade hemaglutinante (AHE), que consiste na pipetagem em placa de microtitulação de alíquotas de 25 µL de NaCl 0,15 M, da amostra (5 mg/mL) e de eritrócitos 2 % v/v de diferentes animais (rato e coelho). Para a purificação das lectinas foram utilizadas duas resinas cromatográficas distintas, a primeira foi a de DEAE – Sepharose, na qual as moléculas são separadas por cargas elétricas, e sendo eluídas em gradiente salino de NaCl. A segunda foi a resina de α - Lactose - Agarose, selecionando as moléculas com afinidade a α - lactose, eluindo – as com glicina. Para a avaliação da estabilidade térmica, amostras de proteínas purificadas (1 mg) foram dissolvidas em 1 mL de solução salina (NaCl 0,15 M) e aquecidas durante 60 minutos, a 35 °C, 50 °C, 65 °C, 80 °C, 95 °C e 99 °C durante 1 hora. Alíquotas de 25 µL de cada tratamento acima ficaram em repouso a temperatura ambiente por uma hora e a AHE das proteínas foi analisada. O perfil protéico do extrato e das frações cromatográficas foi obtido pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE). Para a visualização de glicoproteínas, os géis foram corados com o Reagente de Schiff (Sigma), apresentando, desta forma, uma cor púrpura para as bandas formadas por glicoproteínas. A determinação da massa molecular e a sequência N – terminal da proteína purificada foi realizada por meio de espectrometria de massas por MALDI-TOF no espectrômetro Voyager DE PRO da PerSeptive Biosystems. Os espectros de massas dos peptídeos obtidos por MALDI-TOF foram analisados e a identificação dos peptídeos por peptide mass fingerprinting foi realizada utilizando o programa MS – FIT (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtm13.2/msfit.htm>) e os bancos de dados mais recentemente atualizados do NCBI e Swiss – PROT.

### 3. Resultados e Discussão

Inicialmente, o extrato protéico das sementes de *Swartzia laevis* apresentou hemólise para o sangue de todos os animais testados, dificultando assim a visualização da presença ou ausência de lectina(s) na amostra, uma vez que para ocorrer a hemaglutinação é necessária a integridade dos eritrócitos. Por meio de pesquisas literárias, conseguimos inferir que esse efeito hemolítico poderia ser devido a um grupo de

biomoléculas em especial, as saponinas (Marqui *et al.*, 2008). A fim de se fracionar o extrato protéico obtido a partir das sementes de *Swartzia laevicarpa*, a amostra foi aplicada em uma coluna de troca aniônica em resina de DEAE – Sepharose Fast Flow. Nessa cromatografia, obteve-se três picos de absorvância, que foram dialisados, liofilizados e testados quanto à presença da AHE. As frações que correspondem ao PII foram as únicas que apresentaram AHE com eritrócitos de coelho 2 % v/v. Desta forma, realizou-se o ensaio de inibição da AHE, por meio do qual descobrimos que as lectinas das sementes de *S. laevicarpa* possuem afinidade por D - galactose e  $\alpha$  - lactose. A partir desses resultados selecionamos uma coluna de afinidade para tentar isolar a provável lectina(s). E com base no ensaio de inibição da AHE, aplicamos 80 mL do extrato protéico de *Swartzia laevicarpa* 2,5 mg/mL numa coluna contendo a resina  $\alpha$  - Lactose – Agarose.

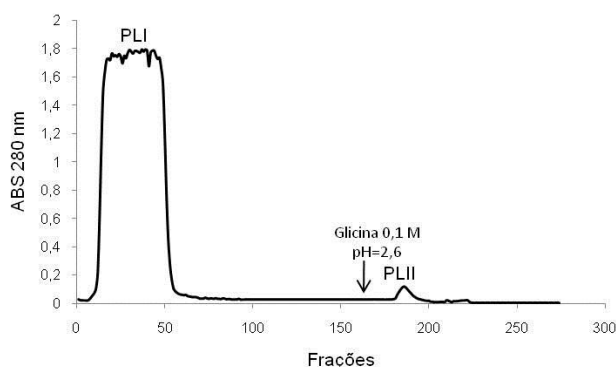


Figura 1: Cromatografia de afinidade  $\alpha$ - Lactose- Agarose do extrato protéico de *Swartzia laevicarpa*.

O perfil protéico do extrato e das frações que correspondem ao PLII, provenientes da cromatografia de afinidade  $\alpha$  - Lactose - Agarose foi obtido por SDS-PAGE 12,5% p/v em condições desnaturantes. Indicando provável purificação de lectina(s), visto a presença de uma banda protéica de, aproximadamente, 30 kDa, a qual corresponde à massa molecular característica desse grupo de lectinas de Leguminosas. Para avaliar se a(s) lectina(s) purificada(s) é composta de subunidades, as frações correspondentes ao PLII foram aplicadas em SDS - PAGE sob duas condições distintas: em condições redutoras (na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol) e em condições não-redutoras (na ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol). Por meio da comparação do número de bandas contidas no SDS - PAGE, pode-se inferir que a provável lectina de sementes de *S. laevicarpa* possui uma única cadeia, uma vez que as frações com  $\beta$ -mercaptoetanol, apresentou apenas uma única banda protéica de 30 kDa. Outra forma de caracterização para as lectinas consiste em determinar a presença de um carboidrato ligado covalentemente a sua estrutura, a fim de classificá-las como glicoproteínas. Para tanto, aplicamos uma alíquota do PLII em um SDS-PAGE e posteriormente, fez-se a coloração com reagente de Schiff. A partir destes testes, constatamos que a provável lectina de *Swartzia laevicarpa* é uma glicoproteína pela comparação com os resultados de outras duas proteínas, a Concanavalina A, uma lectina não glicosilada, e a Ribonuclease B, uma clássica glicoproteína.

Para se verificar a estabilidade da proteína frente a variações de temperatura, a lectina de *Swartzia laevicarpa* foi submetida a diferentes temperaturas e em seguida, observada a AHE. Houve diminuição do título hemaglutinante aos 95°C de 2<sup>8</sup> para 2<sup>7</sup> e aos 99°C de 2<sup>7</sup> para 2<sup>1</sup>. Deste modo, podemos inferir que a lectina de *Swartzia laevicarpa* é termoestável. Porém, a estabilidade térmica a altas temperaturas não parece ser comum as lectinas de gêneros próximos ao da *Swartzia*, como observado no trabalho de Oliveira *et al.* (2002), o qual conseguiu purificar uma lectina com afinidade a D-galactose de sementes de *Luetzelburgia auriculata* e ocorreu perda de função protéica depois de 5 minutos a 80 °C.

Por meio da análise dos dados de purificação cromatográfica e caracterização, obtidos até o momento, procedeu-se a análise de espectrometria de massa, a fim de se determinar a massa molecular da lectina. O espectro de massas das frações referentes ao PLII da cromatografia de afinidade  $\alpha$  - Lactose – Agarose indicou, por análise no banco de dados do equipamento, que as sementes de *Swartzia laevicarpa* possui uma lectina com massa molecular igual a 29,009 kDa.

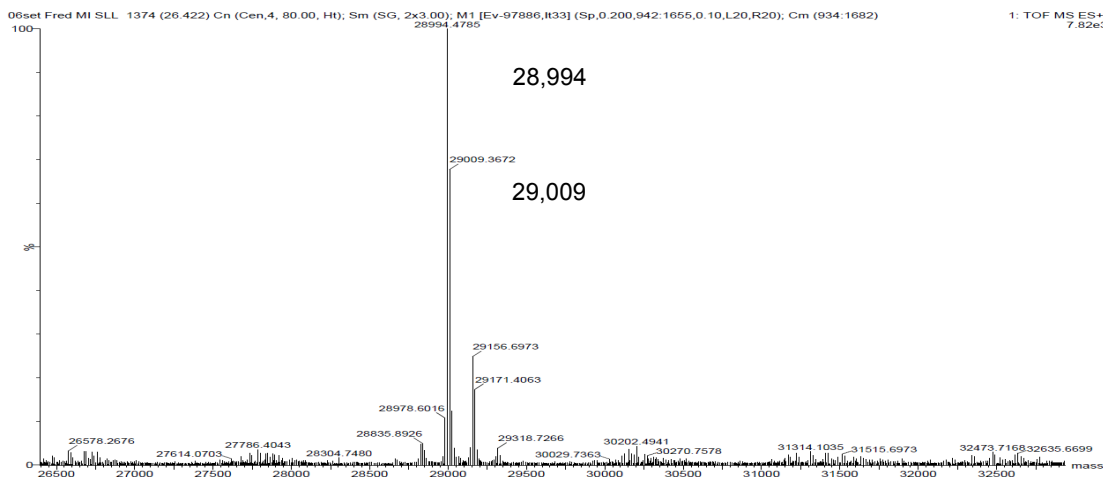


Figura 2: Espectro de massas TOF – MS da lectina de *Swartzia laeviscarpa* (Matrix – assisted laser – desorption ionization).

A proteína purificada foi submetida ao sequenciamento automático de aminoácidos, a fim de se obter a sua região N – terminal e concluir sobre a sua identidade (Tabela 1).

A sequência N – terminal da lectina de *Swartzia laeviscarpa*, assim como pode ser visto na **Tabela 1**, apresentou similaridade com outras cinco lectinas de leguminosas, sendo quatro delas provenientes de sementes e apenas uma de advinda de casca. De acordo com Li *et al.* (2012), as lectinas de outros órgãos vegetais, como folhas, cascas e raízes, podem apresentar grande homologia com lectinas de sementes, indicando uma sequência de aminoácidos similar.

Outro ponto relevante a se ressaltar entre as lectinas de *Swartzia laeviscarpa*, *Sophora japonica* e *Glycine max* é que todas possuem as seguintes características em comum: afinidade com N – acetil – D – galactosamina, estrutura em cadeia única e todas são glicosiladas. Além disso, as tribos filogenéticas de todas essas espécies estão evolutivamente próximas e descendem da tribo Swartzieae, na qual a *Swartzia laeviscarpa* faz parte.

Tabela 1: Análise comparativa da seqüência de aminoácidos da lectina da semente de *Swartzia laeviscarpa* com as lectinas das sementes de *Sophora japonica*, da casca de *Sophora japonica*, da semente de *Vatairea macrocarpa* e da semente de *Glycine max* e da semente de *Luetzelburgia auriculata*.

Identification	Organism	Sequence*	ID (NCBI)	% similarity	E-value
Seed lectin	<i>Swartzia laeviscarpa</i>	1ADIVSFYTKFRFPNQEDLLIQGDAFVSSGKIQLTAVDD39	-	-	-
Seed lectin	<i>Sophora japonica</i>	1AEILSFSFPKFAFNQEDLLIQGDAIVSSGKIQLTITVEN39	gbIAAB51441	25/39 (64%)	1e-05
Bark lectin	<i>Sophora japonica</i>	1AEILSFSFPKFAFNQEDLLIQGDAIVSSGKIQLTITVEN39	gbIAAB51458	25/39 (64%)	1e-05
Seed lectin	<i>Vatairea macrocarpa</i>	1SEVVSFSFTKENPNPKDIILQGDALVTSKGKIQLTIKVKD39	p81371	24/39 (62%)	3e-06
Seed lectin	<i>Glycine max</i>	1AETVVSFSFNKFAFNQEDLLIQGDAIVTSSGKIQLNKVIDE39	gbIAAA33983	23/39 (59%)	3e-05
Seed lectin	<i>Luetzelburgia auriculata</i>	1SEVVSFSFTKENPNQKDI119	[16]		

A partir deste momento denominamos a lectina de sementes de *Swartzia laeviscarpa* como SLL (*Swartzia laeviscarpa lectin*).

**4. Conclusão**

O extrato protéico de *Swartzia laevicarpa* apresentou, inicialmente, hemólise para todos os eritrócitos testados, provavelmente pela alta concentração de saponinas, característica desse gênero botânico.

Por meio da cromatografia de troca iônica em DEAE – Sepharose e da cromatografia de afinidade  $\alpha$ -Lactose - Agarose, conseguiu-se, respectivamente, remover as moléculas que causavam hemólise e purificar a SLL.

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE) indicou que a SLL possui uma massa molecular de, aproximadamente, 29 kDa. A SLL é formada por apenas uma subunidade e está ligada covalentemente a carboidrato, ou seja, SLL é uma glicoproteína.

A análise da estabilidade térmica indicou que a SLL é termoestável e por meio da espectrometria de massas, determinou-se que a massa molecular é igual a 29,009 kDa.

Todos os resultados obtidos e aqui apresentados contribuem fortemente para o projeto “Moléculas com potencial antifúngico em sementes, folhas e casca de espécies arbóreas: prospecção, uso e sustentabilidade da flora amazônica”. Pois, uma vez que se tem a lectina purificada, o próximo passo será testá-la quanto a sua capacidade em inibir fungos fitopatogênicos.

### 5.Referências Bibliográficas

De Hoff, P.L.; Brill, L.M.; Hirsch, A.M. 2009. Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Mol. Genet. Genomics*, 282: 1 - 15.

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.

Freitas, C.D.; Ramos, M.V.; Souza, D.P.; Filho, J.D.B.M.; Teixeira, F.M.; Oliveira, J.S. 2011. Correlações entre atividade inseticida e resistência a proteólise de duas lectinas vegetais glicose/ manose. *Comunicata Scientiae*, 2: 34 - 41.

Li, T.; Yin, X.; Liu, D.; Ma, X.; Lv, H.; Sun, S. 2012. Isolation and characterization of a novel lectin with antifungal and proliferative activities from *Sophora alopecuroides* seeds. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 1 – 8.

Marqui, S.R.; Lemos, R.B.; Santos, L.A.; Gamboa, I.C.; Cavalheiro, A.J.; Bolzani, V.S.; Silva, D.H.S. 2008. Saponinas antifúngicas de *Swartzia langsdorffii*. *Química Nova*, 31: 828 - 831.

Melo, V.M.M.; Vasconcelos, I.M.; Gomes, V.M.; Da cunha, M.; Soares, A.A.; Oliveira, J.T.A. 2005. A cotyledonary agglutinin from *Luetzelburgia auriculata* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus niger* and impairs glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Plant Science*, 169: 629 - 639.

Pinto, L.S.; Neto, M.A.; Bacarin, M.A.; Castellón, R.R.; Gadelha, T.S.; Gadelha, C.A.; Cavada, B.S. 2005. Caracterização química e bioquímica de sementes de *Bauhinia variegata* L. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 9: 385 – 390.

Rüdiger, H.; Gabius, H.J. 2001. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate Journal*, 18:589-613.

Sharon, N.; Lis, H. 1990. Legume lectins – a large family of homologous protein. *The FASEB Journal*, 4: 3198 - 3208.