

DETECÇÃO DE ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE EM EXTRATOS DE SEMENTES DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS DA AMAZÔNIA

Ana Maria Silva dos SANTOS¹; José Francisco de Carvalho GONÇALVES²; Larissa Ramos CHEVREUIL³; Andreia Varmes FERNANDES⁴

¹Bolsista PIBIC/FAPEAM/INPA; ²Orientador CPST/INPA; ³Co-orientadora Bolsista PCI/CPST/INPA; ⁴Colaboradora Pesquisadora CPST/INPA

1. Introdução

A família Fabaceae é uma das famílias botânicas de maior importância econômica da flora Amazônica. Destaca-se pela representatividade na cobertura florestal, fixação de nitrogênio, alto valor agregado de suas espécies madeireiras e, mais recentemente, pelo potencial econômico dos seus produtos não-madeireiros como óleos, resinas, pigmentos, fármacos, gomas naturais e outras moléculas, incluindo as proteínas, que têm recebido especial atenção da comunidade científica, visando consolidar uma nova cadeia de produtos biotecnológicos na área florestal (Barbosa *et al.*, 2006; Behrens *et al.*, 2006; Chevreuril *et al.*, 2009). As proteínas, de maneira geral, têm indiscutível significado biológico e, algumas classes de proteínas participam de forma determinante no metabolismo celular, como por exemplo, as lectinas, que são amplamente distribuídas na família Fabaceae, correspondendo de 2% a 10% de proteínas solúveis das sementes e, em cotilédones constituem cerca de 10% do nitrogênio total (Moreira *et al.*, 1991). Essas proteínas são caracterizadas pela sua capacidade de ligar-se covalente e reversivelmente a carboidratos ou glicoconjugados, sendo classificadas de acordo com seus aspectos estruturais e funcionais (Cavada *et al.*, 1993; Peumans *et al.*, 2001). Devido sua ampla variedade de especificidade por carboidratos, despertaram o interesse pelas investigações de várias funções endógenas e exógenas às plantas. Dentre as funções endógenas, podem atuar como proteínas de reserva e na regulação hormonal e, quanto às funções exógenas, estas proteínas podem atuar na defesa das plantas contra o ataque de patógenos, além de poderem contribuir na simbiose entre plantas de leguminosas e as bactérias do gênero *Rhizobium* (Peumans e Van Damme 1995; Rudiger, 1997).

Apesar do crescente interesse sobre os aspectos estruturais e funcionais das lectinas vegetais, ainda há poucas informações sobre sua ocorrência em espécies pertencentes à flora Amazônica (Chevreuril *et al.*, 2009). No sentido de contribuir com a prospecção sistemática destas proteínas, o objetivo deste trabalho foi detectar em extratos protéicos de sementes de leguminosas arbóreas, a possível presença de lectinas, a partir de ensaios de hemaglutinação, visando obter princípios com potencial bioativo.

2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal

Sementes das espécies: *Centrosema triquetrum* (Benth.) Benth; *Crudia oblonga* Benth; *Copaifera venezuelana* Pittier; *Dalbergia spruceana* Benth; *Dicorynia paraensis* Benth; *Macrolobium multijugum* Benth; *Macrosamanea spruceana* Benth; *Ormosia smithii* Rudd; *Parkia multijuga* Benth; *Swartzia argentea* Benth; *Swartzia ingifolia* Ducke; *Swartzia laevis* Amshoff; *Swartzia polyphylla* DC; *Swartzia sericea* Taub; *Zygia inaequalis* (Willd.) Pittier e *Zygia unifoliolata* (Benth) Pittier, provenientes do banco de leguminosas do INPA/CPCA, foram utilizadas para a extração de proteínas.

2.2. Determinação de proteína bruta

O material pulverizado foi seco em estufa a 65°C, em seguida submetido à digestão, em um bloco digestor a 350°C, em tubos contendo selenito de sódio, sulfato de cobre, sulfato de sódio, ácido salicílico e ácido sulfúrico. Após a digestão e resfriamento das amostras procedeu-se a destilação. Para a titulação utilizou-se solução de ácido sulfúrico a 0,01 N. A determinação de proteína bruta foi realizada a partir da quantificação de nitrogênio total e, sua conversão utilizando o fator 5,71 (FAO, 1982; Ezeagu *et al.*, 2002).

2.3. Isolamento de proteínas

Sementes inteiras foram trituradas em moinho analítico até a obtenção de material finamente pulverizado, o qual foi homogeneizado em solução de NaCl 0,15 M (10% p/v) durante 2 horas a temperatura ambiente e centrifugado a 5000 g, durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi dialisado contra água destilada, durante 48 horas, para a retirada do sal, resultando no extrato total.

2.4. Determinação de proteínas solúveis

Os extratos protéicos de cada espécie tiveram suas concentrações de proteínas estimadas a partir de 50 µL das amostras, incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente com 2,5 mL do reagente de Bradford e, a concentração de proteínas foi estimada espectrofotometricamente a $\lambda=595$ nm (Bradford,1976).

2.5. Detecção da atividade hemaglutinante (AHE)

Amostras de sangue de animais saudáveis (camundongo, hamster, rato branco, coelho e peixe), provenientes do biotério do INPA e da Coordenação de Pesquisas em Aquicultura (CPAQ), foram coletadas e homogeneizadas em solução anticoagulante (2,05% de glicose; 0,8% de citrato de sódio e 0,42% de NaCl, pH 6,1). Os eritrócitos foram lavados quatro vezes com solução salina (NaCl 0,15 M, 10% p/v) a 1000 g durante 10 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspenso na mesma solução salina de modo a obter uma suspensão final de eritrócitos a 2% (v/v). O ensaio de hemaglutinação foi realizado em placas de microtitulação contendo 8 fileiras de 12 poços cada, totalizando 96 poços, os quais foram preenchidos com 50 µL de solução salina, 50 µL dos extratos protéicos e 50 µL de suspensão de eritrócitos a 2%.

2.6. Inibição da atividade hemaglutinante (AHE)

O ensaio foi realizado em placas de microtitulação contendo 8 fileiras de 12 poços cada, totalizando 96 poços. O controle negativo foi preparado pela adição de 100 µL de solução salina e 50 µL da suspensão de eritrócitos (2%). O controle positivo pela adição de 50 µL de solução salina, 50 µL da suspensão de eritrócitos (2%) e 50 µL dos extratos protéicos estudados. O ensaio consiste 50 µL de extrato total das espécies estudadas, pré-incubada com igual volume de soluções a 0,1 M de diferentes açúcares (glicose, lactose, sacarose, galactose, frutose, fucose, manose, N-acetil glicosamina, maltose e arabinose), seguida da adição de 50 µL de solução salina. A mistura foi mantida durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período, 50 µL da suspensão de eritrócitos (2%) foi adicionada em cada "poço" da placa de microtitulação. As placas foram incubadas "overnight" em geladeira (4°C).

2.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

A análise do perfil protéico foi realizada segundo o método descrito por Laemmli (1970).

O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue e quando necessário o gel foi corado com o reagente de nitrato de prata. Como marcadores de massa molecular utilizou-se o da Promega (10 a 225 KDa) e da Fermentas (10 a 260 KDa).

3. Resultados e Discussão

3.1. Determinação de proteína bruta e solúvel

Os teores de proteína bruta, estimados nas sementes das espécies de leguminosas estudadas, variaram de 6,2 a 14,3%, com destaque para *C. oblonga* e *D. paraensis* que apresentaram os menores e maiores valores, respectivamente. Ao passo que, a variação do teor de proteína solúvel foi de 1,5% a 20,7%, sendo o menor valor também encontrado para *C. oblonga* e o maior para *S. laevicarpa*. O teor de proteína solúvel, assim como os de proteína bruta, variou mesmo entre espécies pertencentes à mesma subfamília. Contudo, *S. argentea*, *Z. inaequalis* e *Z. unifoliolata* apesar da alta concentração de proteína bruta, apresentaram baixos teores de proteínas solúveis, quando comparado à *D. paraensis*, *S. ingifolia*, *S. sericea* e *S. polyphylla* que possuem alta concentração para os dois tipos de proteínas, enquanto que *C. oblonga* exibiu as menores concentrações, tanto de proteína bruta quanto solúvel. Os dados de proteína bruta encontrados em sementes de para outras espécies de leguminosas arbóreas da flora Amazônica, apresentaram concentração de 9 e 21% para *Parkia multijuga* e *Enterolobium schomburgkii*, duas Mimosoideae, e para a concentração de proteína solúvel de *Peltogyne venosa* e *Swartzia polyphylla* (Papilionoideae), apresentaram maiores teores protéicos que *Caesalpinia ferrea* e *Cedrelinga catenaeformis* (Caesalpinoideae)(Bariani, 2008; Chevreuil, 2009). Estudos com espécies de

leguminosas do cerrado demonstraram variação dos teores de proteína bruta de 9% a 30%, sendo as maiores concentrações encontradas em sementes de *Acosmium subelegans*, *Anadenanthera peregrina* var. *falcata* e *Crotalaria flavicoma* e as menores em *Andira laurifolia*, *Copaífera langsdorfii*, *Dimorphandra mollis*, *Hymenaea stigonocarpa* e *Inga uraguensis* (Sasaki, 2008).

Desta forma, tanto o conteúdo de proteína bruta quanto o teor de proteínas solúveis, estimados nas sementes das espécies em estudo, corroboram com resultados encontrados em outras espécies de leguminosas, seja do bioma amazônico seja de outro bioma como os teores das leguminosas do cerrado.

3.2. Detecção da atividade hemaglutinante (AHE)

Os extratos protéicos das espécies estudadas apresentaram AHE diferenciada entre os eritrócitos utilizados, onde *S. argentea*, *S. polyphylla*, *S. sericea*, *M. spruceana* e *Z. inaequalis* hemaglutinaram "fortemente" todos os eritrócitos testados, sendo a AHE expressiva, pois requerem de menor conteúdo protéico para promover a hemaglutinação, ao passo que as espécies *C. oblonga*, *D. paraensis* e *Z. unifoliolata* não apresentaram AHE para os eritrócitos testados. Os extratos protéicos das espécies *M. multijugum*, *C. triquetrum*, *D. spruceana*, *O. smithii* e *P. multijuga* não hemaglutinaram os eritrócitos de rato branco, hamster e peixe, além de necessitar de alta concentração de proteínas para exercer tal atividade quando incubadas com os outros eritrócitos, destacando-se *P. multijuga* que necessita de 60,15 µg/mL. Essa variação de atividade hemaglutinante também é demonstrada em extratos protéicos de sementes de *C. catenaeformis*, *P. venosa*, *Tachigali plumbea* e *Sesbania exasperata*, que apresentaram concentrações mínimas hemaglutinante de 0,6; 0,25; 0,8 e 0,33 µg/mL, respectivamente (Bariani, 2008; Chevreuil et al., 2009).

A diferença de AHE é comum ocorrer em eritrócitos distintos, pois apesar de as espécies pertencerem à mesma família, a especificidade por carboidratos diverge para cada espécie, o que está diretamente relacionado à composição estrutural das proteínas e à composição química dos eritrócitos, cujo padrão de glicosilação diferencia-se de acordo com a espécie e isto, conseqüentemente, implica se o extrato vegetal promoverá ou não a hemaglutinação, dependendo da ocorrência ou não de lectinas (Moreira et al., 1990; Chrispeels et al., 1991; Martinez et al., 2005).

3.3. Inibição da atividade hemaglutinante

A inibição da AHE foi realizada com diferentes açúcares e eritrócitos de camundongo, sendo este selecionado mediante a maior afinidade de hemaglutinação pelos extratos protéicos. A partir dos resultados obtidos observou-se que os açúcares testados não inibiram a AHE dos extratos protéicos das espécies *C. venezuelana*, *S. argentea*, *S. sericea*, *S. laevicarpa*, *S. polyphylla*, *S. ingifolia*, *M. spruceana* e *Z. inaequalis*. Resultados similares foram obtidos em estudos com extrato protéico de sementes de *Tachigali plumbea*, em que a atividade hemaglutinante não foi inibida pela glicose, sacarose e galactose na concentração de até 100mM (Chevreuil, 2007). Estes resultados confirmam que a inibição da AHE depende da especificidade das lectinas por açúcares, o que está diretamente relacionado à sua composição química e estrutural, bem como ao processo de síntese da molécula de proteína (Moreira et al. 1990). Quanto às espécies *M. multijugum*, *C. triquetrum*, *D. spruceana*, *O. smithii* e *P. multijuga*, não foi detectado inibição, uma vez que no controle positivo não ocorreu hemaglutinação. Como a AHE é a propriedade mais conhecida das lectinas, o ensaio de hemaglutinação é o método mais utilizado para detecção dessas proteínas. Porém, esse ensaio pode apresentar resultado falso positivo se a lectina coexistir com inibidores, com substâncias presentes no sangue, glicoproteínas contendo ácido siálico, amins heterocíclicas, carboidratos e certos íons metálicos, ou ainda, se os receptores para carboidratos presentes nas células não existirem em número suficiente ou estiverem inacessíveis (Toms 1981).

3.4. Eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE)

O perfil protéico dos extratos protéicos estudados revelou bandas de diferentes tamanhos, prevalecendo proteínas de massas moleculares aparente entre 20 kDa a 30 kDa para *S. polyphylla*, *S. sericea*, *S. ingifolia* e *D. spruceana*, confirmando o padrão de massa molecular para lectinas, que tem sido encontrado na literatura (Rüdger, 1998). Com outras leguminosas arbóreas da flora Amazônica, os resultados encontrados para espécies *Ormosia consolata* (20 kDa a 25 kDa) e *Sesbania exasperata* (10 kDa a 30 kDa), duas espécies pertencentes a mesma subfamília Papilionoideae também sugeriram a presença destas proteínas (Chevreuil, 2009). *C. triquetrum* exibiu duas bandas nítidas de aproximadamente 20 e 45 kDa. Ao passo que *M. spruceana*, *C. venezuelana*, *D. paraensis*, *M. multijugum* e *Z. unifoliolata* apresentaram massas entre 10 kDa e 20 kDa. No que diz respeito às espécies *P. multijuga*, *O. smithii*, *S. argentea*, *Z. inaequalis* e *C. oblonga* observou-se maior distribuição de proteínas com massas moleculares acima de 30 kDa.

Estudos em sementes de leguminosas como *Vicia faba*, *Psium sativum*, *Phaseolus vulgaris* e *Phaseolus aureus*, também apresentaram bandas protéicas acima de 30 KDa, variando de 33KDa a 35KDa (Silva, 2001).

Considerando que a massa molecular das subunidades de lectinas de leguminosas está em torno de 30 KDa, sugere-se que as espécies em estudo apresentam esta classe de proteínas. No entanto, ensaios de purificação poderão comprovar em definitivo a presença destas proteínas nas sementes de leguminosas arbóreas da flora Amazônica.

4. Conclusão

As espécies estudadas, com exceção *C. oblonga*, *D. paraensis* e *Z. unifoliolata*, apresentaram atividade hemaglutinante para diferentes eritrócitos de animais, fato que representa a primeira confirmação de lectinas nos extratos protéicos.

Dentre as espécies com afinidade por eritrócitos testados, *S. argentea*, *S. polyphylla*, *S. sericea*, *S. laevicarpa*, *M. spruceana* e *Z. inaequalis* destacam-se por requererem menor conteúdo protéico para exercer a AHE. Adicionalmente, o perfil protéico das espécies *S. argentea*, *S. polyphylla* e *S. laevicarpa* revelou proteínas com massa molecular aparente entre 20 KDa a 30kDa, sugerindo desta forma, a possível presença de lectinas, confirmando o potencial dessas espécies para futuros estudos biotecnológicos.

5. Referências

- Barbosa, A.P.; Palmeira, R.C.F.; Nascimento, C.S.; Feitosa, D.S.; Cunha, M.S.C. 2006. Leguminosas Florestais da Amazônia Central I. Prospecção de compostos presentes na casca de espécies arbóreas. *Revista Fitos*, 1(3): 47-57.
- Bariani, A. 2008. *Propriedades bioquímica e biológicas de proteínas de sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia*. Dissertação (Mestrado em Ciências de Florestais Tropicais) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. 122f.
- Behrens, M.D.; Tappin, M.R.R.; Favoreto, R.; Silva, V.P.; Nakamura, M.J.; Barbosa, A.P.; Sousa, L.A.; Siani, A.C. 2006. Estudo prospectivo de leguminosas da Amazônia Central II. Composição química das sementes. *Revista Fitos*, 1(3): 58-64.
- 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.
- Cavada, B.S.; Moreira, R.A.; Oliveira, J.T.A.; Grangeiro, T.B. 1993. Primary structure and functions of plant lectins. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 5:193-20.
- Chevreuil, L.R. 2007. Caracterização de proteínas com AHE em sementes de *Sesbania exasperata* H. B. K. e de *Tachigali plumbea* Ducke. Monografia, Universidade Estadual do Amazonas/Escola Superior de Tecnologia/Curso de Engenharia Florestal, Manaus, Amazonas. 38p.
- Chevreuil, L.R.; Gonçalves, J.F.C.; Bariani, A.; Rodrigues, J.V.F.C; Pando S.C. 2009. Detecção de inibidores de tripsina e atividade hemaglutinante em sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia. *Acta Amazonica*, 39(1):199-206.
- Chrispeels, M.J.; Raikhel, N.V. 1991. Lectins, lectin genes and their role in plant defense. *Plant Cell*, 3(1): 1-9.
- Ezeagu, I.E.; Petzke, J.K.; Metges, C.C.; Akinsoyinu, A.O.; Ologhobo, A.D. 2002. Seed protein contents and nitrogen-to-protein conversion factors for some uncultivated tropical plant seeds. *Food Chemistry*, 78:105-109.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 1982. *Food composition tables for the near East. Food and nutrition paper*, 26. Rome: FAO/UN.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Martinez, C.R.; Netto, A.M.; Figueiredo, M.V.B.; Cavada, B.S.; Lima, J.L. 2005. Kinetic sedimentation of *Rhizobium*-aggregates produces by leguminous lectins. *World Journal of Microbiology e Biotechnology*, 21(1): 75-82.
- Moreira, R.A.; Cavada, B.S.; Oliveira, J.T.A. de; Ainouz, I.L. 1990. Plant lectins. *Proceeding of the first Brazilian congress on proteins* – COBRAP, 90: 73-96.

- Moreira, R.A.; Ainouz, I.L.; Oliveira, J.T.A.; Cavada, B.S. 1991. Plant lectins, chemical and biological aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 86(II): 211-218.
- Peumans, W.J.; Van Damme, E.J.M. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, 109(2): 347-352.
- Peumans, W.J.; Van Damme, E.J.M.; Barre, A.; Rougé, P. 2001. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionarily related proteins. *Mol. Immunol. Compl.*, p.27-54.
- Rüdiger, H.; Structure and function of plants lectins. In: Gabius, H.J. and Gabus, S., 1997. *Glycosciences: Status and perspective*. New York: Chapman and Hall – Weinheim. p.415-438.
- Rüdiger, H. 1998. Plant lectins – more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure and possible functions of plant lectins. *Acta Anatomica*, 161:130-152.
- Sasaki, M. 2008. *Lipídios, carboidratos e proteínas de sementes de leguminosas do cerrado*. Dissertação (Mestrado: Ciências – Botânicas, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo – USP), São Paulo, SP. 75p.
- Silva, A.L.C.S.; Horta, A.C.G.; Moreira, R.A.M. 2001. Isolation and partial characterization of a lectin from *Bauhinia pentandra* (Bong) Vog. ex. Steud. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13(3): 262-268.
- Toms, G.C. 1981. Lectins in Leguminosae. In: Polhill, R. M. & Raven, P. H., (Eds *Advances in Legumes Systematic*. Royal Botanic Garden, Kew.