

Purificação parcial, Caracterização e Imobilização de lectina de sementes de *Brosimum gaudichaudii*.

MACHADO, Paula Marce Fernandes ¹; **FERNANDES**, Kátia Flávia ²

^{1,2}Laboratório de Química de Proteínas – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. pmarce@pop.com.br e kátia@icb.ufg.br

Palavras – chaves: lectinas, imobilização

1. INTRODUÇÃO

As lectinas são proteínas de origem não imune, com capacidade de reconhecimento específico e de realizar ligação reversível a carboidratos. As lectinas tem aplicação bastante ampla, entre as quais podem ser destacadas a identificação da presença de carboidratos em biopolímeros ou glicoconjugados; cromatografia de afinidade para o isolamento de glicoproteínas, hormônios, neurotransmissores e compostos relacionados (SILVA, 1991; OTHA *et al.*, 1992).

Devido a grande diversidade de características, aplicações e ao potencial biotecnológico, as lectinas estão sendo largamente estudadas. No Laboratório de Química de Proteínas (LQP), da Universidade Federal de Goiás (UFG), várias plantas do cerrado têm sido testadas quanto à presença de lectinas. Dentre as mais promissoras está a Mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii*). Testes preliminares revelaram que estas lectinas apresentam especificidade de ligação à lactose, podendo ser utilizadas na remoção deste açúcar, devido à afinidade de ligação da lectina. Neste trabalho a lectina de mama-cadela foi parcialmente purificada, caracterizada e imobilizada em polianilina.

2. METODOLOGIA

2.1 Amostragem

As plantas foram coletadas no Cerrado goiano, no município de Aragoiânia.

2.2 Preparo da farinha da planta

As sementes de Mama-cadela foram trituradas, posteriormente delipidadas por 24h com hexano. Após completa secagem, a farinha foi armazenada a 4° C até sua utilização.

2.3 Extração das lectinas

A extração foi realizada em solução NaCl 0,15 mol L⁻¹ e tampão glicina 0,1 mol L⁻¹, em pH 2,6 e pH 9,0; sob agitação a 4°C por 60 minutos, seguida de centrifugação. O sobrenadante obtido foi denominado extrato bruto (EB).

2.4 Determinação da atividade hemaglutinante e inibição da atividade por açúcares

A atividade hemaglutinante foi determinada utilizando-se o método descrito por MOREIRA & PERRONE (1977), usando suspensão de hemácias de coelho a 2% (v/v). Para os testes de inibição da hemaglutinação, alíquotas de açúcar foram diluídas seriamente em solução NaCl 0,15 mol L⁻¹, misturadas com igual volume de solução de lectina, deixando interagir por 30 min a 37°C e deixados em repouso por mais 30 min a temperatura ambiente. A suspensão de hemácias de coelho a 2% foi adicionada em cada tubo e deixados por 30 min a 37°C e deixados em repouso por mais 30 min a temperatura ambiente. A seguir, o material foi centrifugado em baixa velocidade por 30

segundos e as leituras feitas macroscopicamente e a concentração mínima de açúcar mostrando inibição de hemaglutinação foi relatada.

2.5 Ensaio de termoestabilidade da lectina

A estabilidade térmica da atividade hemaglutinante presente no EB de *Brosimum gaudichaudii* foi determinada submetendo o EB em diferentes temperaturas (50, 60, 70, 80 e 90° C) durante tempos distintos (5, 10 ,15, 20, 25 e 30 min) e a atividade residual determinada.

2.6 Cromatografia por gel filtração em Sephadex G50 e G75

As cromatografias foram realizadas em uma coluna de vidro medindo 42 x 2 cm. O gel foi entumescido com água na proporção de 1:10 (p/v) por 24 horas. A seguir, a coluna foi montada deixando o gel sedimentar por gravidade. A coluna foi equilibrada e eluída com solução salina 0,15 mol L⁻¹ a um fluxo de 1 mL/min. As frações tiveram suas absorbâncias determinadas em um espectrofotômetro ULTROSPEC 2000(PHARMACIA) a 280 nm. Os picos obtidos foram dialisados, liofilizados e estocados a 4° C para testes posteriores de dosagem de proteína, atividade hemaglutinante e eletroforese em gel de poliacrilamida.

2.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β-mercaptoetanol foram feitos segundo a técnica de LAEMMLI (1970).

2.9 Imobilização da lectina em polianilina

A lectina (EB) foi submetida a imobilização em polianilina ativada com glutaraldeído, nas proporções de 0,5; 0,25 e 1mL para 5.0 com 10 mg de suporte.

2.10 Ensaio da atividade da lectina imobilizada – Produção de açúcar redutor

A atividade da lectina foi medida através da determinação da concentração de açúcar redutor formado, usando o reagente 3,5- dinitrossalicílico (ADNS) (Bernfeld, 1955), usando lactose para curva padrão.

3. RESULTADOS

3.1 Presença de lectina em diferentes extratos.

Concentração de EB	Soluções de extração		
	Tampão glicina 0,1 mol L ⁻¹ pH 2,6	Tampão glicina 0,1 mol L ⁻¹ pH 9,0	Solução NaCl 0,15 mol L ⁻¹
1:2	N	N	P
1:4	N	P	P
1:8	N	P	P
1:16	P	P	P
1:32	P	P	P
1:64	P	P	P
1:128	P	P	P
1:256	P	P	P
1:512	P	P	P
1:1024	P	N	N

Tabela 1- Atividade hemaglutinante em diferentes soluções de extração.

P: positivo
N: negativo

3.2 Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante

Carboidrato	Concentração mínima
Glicose	NI
Galactose	NI
Lactose	0,05 mmol

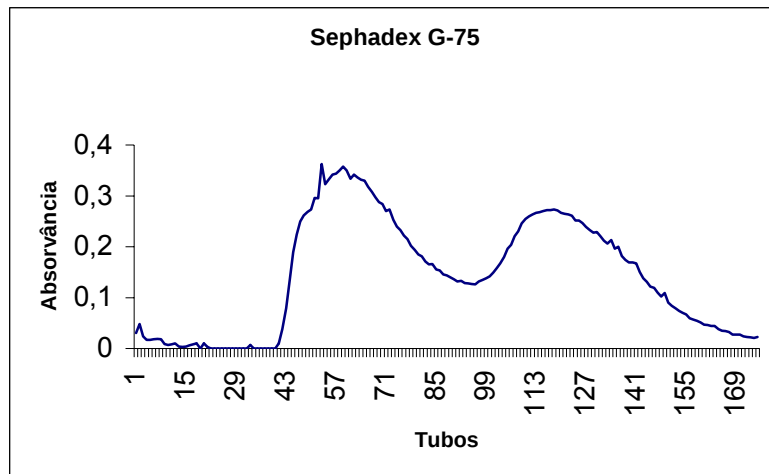
Tabela 2 – Inibição da atividade da lectina por açúcares simples
NI – não houve inibição

3.3 Ensaio de termoestabilidade da lectina

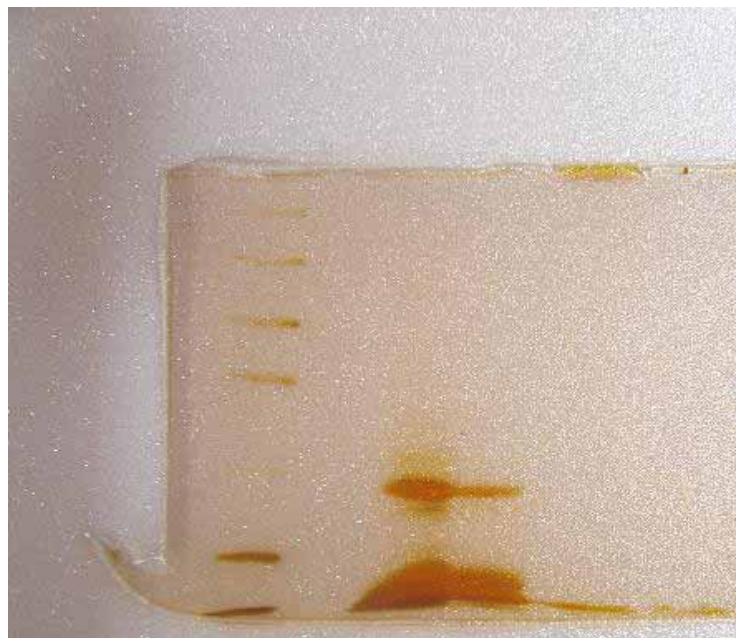
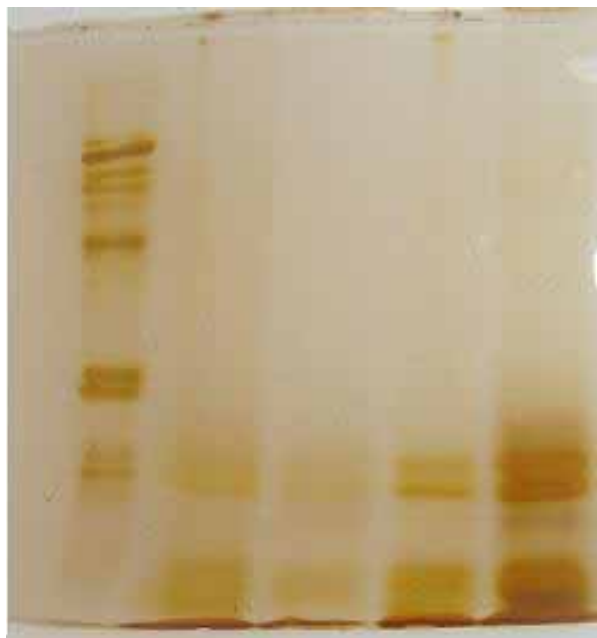
Tempo (min)	Temperatura				
	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C
5	P	P	P	P	P
10	P	P	P	P	P
15	P	P	P	P	P
20	P	P	P	P	P
25	P	P	P	P	P
30	P	P	P	P	N

Tabela 3 – Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante da lectina.

3.4 Cromatografia em Sephadex G-75



3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida



3.6 Imobilização da lectina em polianilina

Concentração EB	5 mg PANI		10 mg PANI	
	Porcentagem	Diferença proteína	Porcentagem	Diferença proteína
250 µL	37,5 %	20,8 µg	47 %	25,8 µg
500 µL	32%	16,8 µg	50 %	16,1 µg
1000 µL	47,2 %	10,3 µg	54,5 %	14,1 µg

4. CONCLUSÃO

Estes testes preliminares mostram que a lectina de *brosimum gaudichaudii* pode ser utilizada para o isolamento de glicoconjugados e para remoção de lactose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Otha, T.; Inque, T.; Takitani, S. *Chromatografia*. n.33, p.113-116. 1992.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685, 1970.

Vasconcelos, I. M; Grangeiro, T. B; Moreira, R. A; Cavada, B. S. E; Oliveira, J.T.A. Isolation and characterization of a lectin from *Dioclea lasiophylla* Duke seeds. *Arq. Biol. Tecnol.*, v.32(1), p.151. 1989.

Moreira, R.A; Perrone, J.C. (1977) Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology* 59, 783-787.

Fernandes, K.F, lima, C.S; Pinho, H.; Collins, C.H. Immobilization of horseradish peroxidase onto polyaniline polymers. *Process biochemistry*, 1379-1384. 2003.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CAPES