



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

JOSÉ CARLOS DO SACRAMENTO NETO

PURIFICAÇÃO DE LECTINA PRESENTE NAS SEMENTES DE *Dioclea*
megacarpa ROLFE

FORTALEZA – CE

2023

JOSÉ CARLOS DO SACRAMENTO NETO

**PURIFICAÇÃO DE LECTINA PRESENTE NAS SEMENTES DE *Dioclea*
megacarpa ROLFE**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biotecnologia do Centro de Ciências da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito à obtenção do grau de
Bacharelado em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa
Cavada

FORTALEZA – CE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S124p Sacramento Neto, José Carlos do.
Purificação de lectina presente nas sementes de Dioclea megacarpa Rolfe / José Carlos do Sacramento Neto. – 2023.
32 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.

1. Lectinas de Leguminosae. 2. Diocleinae. 3. Sephadex G-50. I. Título.

CDD 661

JOSÉ CARLOS DO SACRAMENTO NETO

PURIFICAÇÃO DE LECTINA PRESENTE NAS SEMENTES DE *Dioclea megacarpa* ROLFE

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do grau de Bacharelado em Biotecnologia.

Aprovado em 04/12/23

BANCA EXAMINADORA

Professor Dr. Benildo Sousa Cavada - Orientador
(Universidade Federal do Ceará - UFC)

Professora. Dra. Kyria Santiago Nascimento
(Universidade Federal do Ceará - UFC)

Dr. Messias Vital de Oliveira
(Universidade Federal do Ceará - UFC)

RESUMO

As Lectinas, caracterizadas pela capacidade de se ligar reversivelmente a carboidratos, são um grupo de moléculas proteicas amplamente distribuídas nos cinco reinos da vida, sendo as lectinas pertencentes ao reino Plantae as mais descritas e estudadas, e a família Leguminosae constituindo o maior número de táxons estudados. O gênero *Dioclea*, pertencente a esta família, é um dos grupos mais citados quanto a presença de lectinas, com consideráveis relatos na literatura de potenciais aplicações na biomedicina, incluindo atividades antimicrobianas e antitumorais, por exemplo. A espécie *Dioclea megacarpa* é uma planta nativa, predominantemente dos estados do norte e nordeste Brasileiro, assim como países da América Central. A partir de protocolos existentes sobre a purificação de lectinas de *Diocleinae*, este estudo adotou tais técnicas para purificação de uma lectina das sementes de *Dioclea megacarpa*. O protocolo estabelecido envolveu a obtenção de farinha fina das sementes através de Trituração em moinho de café, seguido da extração das proteínas totais em solução de NaCl 0,15M. Após a obtenção do extrato protéico, foi realizada cromatografia de afinidade em matriz de Sephadex G-50 para purificação da lectina presente no extrato. O progresso e eficiência do protocolo de purificação foi avaliado através de ensaios de atividade hemaglutinante e de quantificação proteica, determinando a eficácia da realização da cromatografia de afinidade na purificação da lectina, obtendo amostra quase 9 vezes mais purificada que o extrato de proteínas totais, estabelecendo assim, procedimentos a serem utilizados durante novos estudos envolvendo lectinas dessa espécie.

Palavras-chave: Lectinas de Leguminosae; *Diocleinae*; Sephadex G-50.

ABSTRACT

Lectins, characterized by their ability to reversibly bind to carbohydrates, are a group of protein molecules widely distributed in the five kingdoms of life, with lectins belonging to the Plantae kingdom being the most described and studied, and the Leguminosae family constituting the largest number of taxa. studied. The genus *Dioclea*, belonging to this family, is one of the most cited groups regarding the presence of lectins, with considerable reports in the literature of potential applications in biomedicine, including antimicrobial and antitumor activities, for example. The species *Dioclea megacarpa* is a native plant, predominantly from the northern and northeastern Brazilian states, as well as Central American countries. Based on existing protocols on the purification of *Diocleinae* lectins, this study adopted such techniques for purifying a lectin from *Dioclea megacarpa* seeds. The established protocol involved obtaining fine flour from the seeds through grinding in a coffee mill, followed by extraction of total proteins in a 0.15M NaCl solution. After obtaining the protein extract, affinity chromatography was performed on a Sephadex G-50 matrix to purify the lectin present in the extract. The progress and efficiency of the purification protocol was evaluated through hemagglutinating activity and protein quantification assays, determining the effectiveness of carrying out affinity chromatography in lectin purification, obtaining a sample almost 9 times more purified than the total protein extract, establishing thus, procedures to be used during new studies involving lectins of this species.

Keywords: Lectins from Leguminosae; *Diocleinae*; Sephadex G-50.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Classificação Estrutural das lectinas de origem vegetal.....	13
Figura 2 - Estrutura geral de lectinas de Leguminosae	14
Figura 3 - Esquema ilustrativo da permutação circular que ocorre durante a biossíntese da lectina ConA	17
Figura 4 - Exsicata de <i>Dioclea megacarpa</i>	18
Figura 5 - Fruto e sementes de <i>Dioclea megacarpa</i>	19
Figura 6 - Amostra de sementes de <i>Dioclea megacarpa</i> utilizadas no estudo	21
Figura 7 - Cromatografia de Afinidade (Sephadex G-50) para purificação da lectina de <i>Dioclea megacarpa</i>	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais estudos biológicos de lectinas do gênero <i>Dioclea</i>	16
Tabela 2 - Atividade Hemaglutinante de diferentes estágios da purificação da lectina de <i>Dioclea megacarpa</i>	26
Tabela 3 - Estágios de purificação de DmegA	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BioMol-Lab	Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas
CaCl_2	Cloreto de Cálcio
ConA	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
DRD	Domínio de Reconhecimento de Carboidratos
DmegA	Lectina de <i>Dioclea megacarpa</i>
kDa	kiloDalton
MnCl_2	Cloreto de Manganês
NaCl	Cloreto de Sódio
P_1	Primeiro pico de cromatografia
P_2	Segundo pico de cromatografia
pH	Potencial hidrogeniônico
proConA	Proteína glicosilada de ConA
rpm	Rotações por minuto
Sephadex	<i>Separation Pharmacia Dextran</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará
UH	Unidades de Hemaglutinação

LISTA DE SÍMBOLOS

% Porcentagem

α alfa

β beta

γ gama

μL microlitros

$^{\circ}\text{C}$ graus Celsius

Ca^{2+} íon cálcio

cm centímetros

g gramas

min minutos

mL mililitros

mm milímetros

nm nanômetros

Mn^{2+} íon manganês

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1	Lectinas - Definição e Breve Histórico.....	11
2.2	Lectinas - Classificação	12
2.3	Lectinas de Leguminosae	13
2.4	Lectinas de <i>Diocleinae</i>	15
2.5	<i>Dioclea megacarpa</i>	17
3	OBJETIVOS	20
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1	Preparo de farinha fina das sementes de <i>Dioclea megacarpa</i>	21
4.2	Extração de proteínas totais solúveis	22
4.3	Ensaios de atividade hemaglutinante	22
4.4	Atividade hemaglutinante específica	23
4.5	Purificação da lectina de <i>Dioclea megacarpa</i> por cromatografia de afinidade	23
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1	Preparo de farinha fina das sementes de <i>Dioclea megacarpa</i>	25
5.2	Extração de proteínas totais solúveis	25
5.3	Ensaios de atividade hemaglutinante	26
5.4	Atividade hemaglutinante específica	27
5.5	Purificação da lectina de <i>Dioclea megacarpa</i> por cromatografia de afinidade	28
6	CONCLUSÕES	30
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1 INTRODUÇÃO

As lectinas são uma classe de proteínas caracterizadas pela presença de domínio de ligação reversível a carboidratos - DRC (Domínio de Reconhecimento de Carboidratos) sem alterar as estruturas dos seus ligantes (TSANEVA; VAN DAMME, 2020), podendo desempenhar uma ampla variedade de funções e efeitos, desde a sua capacidade de aglutinar eritrócitos, utilizada como primário método de detecção (PEUMANS; VAN DAMME, 1995), até atividade antitumoral, antifúngica, antiviral (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017) e respostas de estresse nas plantas, tornando-as moléculas promissoras para aplicação em diversas áreas, como a biomedicina, através da aplicação das atividades relatadas, ou o melhoramento vegetal (TSANEVA; VAN DAMME, 2020), através da compreensão do papel realizado por essas moléculas em respostas de estresse. Desse modo, a identificação de novas moléculas dessa classe que possuem potencial para aplicação nestas áreas se classifica como uma constante necessidade.

As lectinas se encontram distribuídas por todos os cinco reinos, sendo a maior parte estudada em plantas (TSANEVA; VAN DAMME, 2020), com destaque para a família Leguminosae, constituindo o maior grupo de lectinas existente (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017). O grupo dessas lectinas são caracterizadas pela necessidade de íons divalentes, como predominantemente o Ca^{2+} e Mn^{2+} , para a plena manutenção da sua estrutura tridimensional e consequentemente interação com seus respectivos ligantes (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017), sendo classicamente subdividida nas subfamílias Papilionoideae, Caesalpinoideae e Mimosoideae, com predominância de estudo sobre lectinas nessa ordem.

Dioclea megacarpa é uma espécie pertencente à subfamília Papilionoideae e a subtribo *Diocleinae*, um grupo amplamente estudado pelo potencial de aplicação de suas lectinas na biomedicina (LÓSSIO, 2016). O seguinte trabalho relata a purificação e caracterização parcial de lectina de sementes dessa espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Este trabalho inicia com uma breve revisão da literatura presente sobre a classe de biomoléculas estudada, discorrendo acerca de sua definição e classificação taxonômica, além de breve descrição da espécie estudada.

2.1 Lectinas - Definição e Breve Histórico

As lectinas são um grupo altamente diverso de moléculas proteicas, distribuídas ao longo dos 5 reinos vivos, de vírus a microrganismos, fungos, plantas e animais, sendo caracterizadas pela capacidade de ligar, de forma reversível a carboidratos, sem alterar suas estruturas, podendo desempenhar diversas funções biológicas (TSANEVA; VAN DAMME, 2020), como transporte e armazenamento de carboidratos (KUMAR et al., 2012) e defesa contra agentes patogênicos em plantas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

O estudo das lectinas teve início no final do século IX, a partir da descoberta, em 1888, por Stillmark, de uma proteína tóxica de *Ricinus communis* L., denominada 'Ricina', e da 'Abrina', proveniente de *Abrus precatorius*, por H. Hellin (TSANEVA; VAN DAMME, 2020) (SHARON; LIS, 2004), denominadas, inicialmente como hemaglutininas, devido a atividade hemaglutinante que apresentam, ou fitoaglutininas, devido a sua origem vegetal (SHARON; LIS, 2004). A partir do estudo do efeito dessas proteínas em ratos, Paul Ehrlich, na década de 1890, foi capaz de estabelecer princípios básicos da imunologia, como a especificidade da resposta imune e a memória imunológica (SHARON; LIS, 2004).

O estudo dessas moléculas aumentando conforme novas propriedades e aplicações foram identificadas, como a descoberta da natureza da atividade hemaglutinante característica das lectinas por Sumner e Howell em 1936 (SUMNER; HOWELL, 1936), assim como a descoberta independente da especificidade a diferentes tipos sanguíneos na década de 1940, por Boyd e Renkonen, fundamental para os estudos da especificidade de抗ígenos associados ao sistema ABO de grupos sanguíneos, realizados na década de 1950, por Morgan e Watkins (SHARON; LIS, 2004).

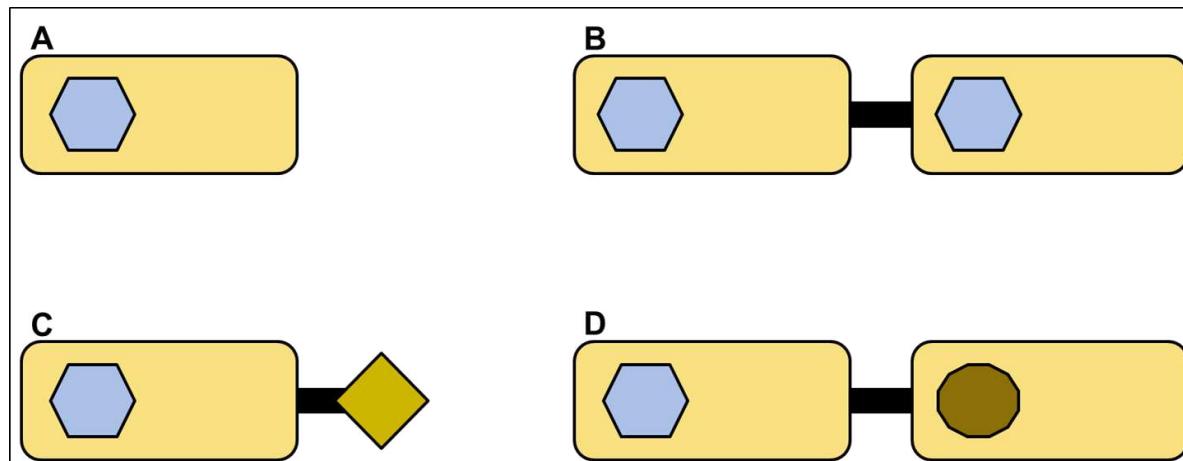
Essas descobertas levaram a proposição, por Boyd e Shapleigh, em 1954, do termo 'Lectina' (originário do latim *lego*, significando escolher) (BOYD;

SHAPLEIGH, 1954), devido a sua especificidade (ou capacidade de ‘escolha’) de aglutinação a diferentes tipos sanguíneos como denominação dessa classe de proteínas proveniente de plantas. Atualmente, no entanto, devido a avanços no seu estudo, as lectinas abrangem muito mais do que apenas proteínas aglutinantes como as descobertas por Stillmark e H. Hellin, com a definição atual, estabelecida por Peumans e Van Damme, em 1995, determinando que o único requisito para a identificação de uma proteína como sendo uma lectina é a presença de, pelo menos, um domínio não-catalítico que se liga, reversivelmente, a um carboidrato específico(PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

2.2 Lectinas - Classificação

Devido a sua ampla distribuição e variedade, as lectinas podem ser classificadas de diversas formas, com uma das principais classificações sendo a respeito da sua estrutura molecular, subdividindo as lectinas em 4 grupos (**Figura 1**): ‘Merolectinas’, possuindo apenas 1 domínio lectínico, ‘Hololectinas’, possuindo 2 ou mais domínios lectínicos, ‘Quimerolectinas’, possui pelo menos um domínio não catalítico, e as ‘Superlectinas’, que são constituídas de mais de domínio lectínico, com diferentes especificidades a carboidratos (TSANEVA; VAN DAMME, 2020). Essas diferenças estruturais afetam a capacidade de aglutinação das lectinas, com apenas as pertencentes aos grupos das hololectinas e superlectinas, devido a presença dos 2 domínios de ligação a carboidratos necessários para o exercício dessa atividade (AND; SHARON*, 1998; LÓSSIO, 2016) .

Figura 1: Classificação Estrutural das lectinas de origem vegetal: **A:** Merolectinas, **B:** Hololectinas, **C:** Quimolectinas, **D:** Superlectinas, onde o hexágono azul representa o Domínio de Reconhecimento de Carboidratos, o losango amarelo representa um domínio não catalítico e o dodecaedro marrom representa um Domínio de Reconhecimento de Carboidratos distinto.



Fonte: (TSANEVA; VAN DAMME, 2020). (Modificado pelo Autor)

Outras classificações das lectinas incluem a classificação com relação a sua afinidade de ligação, subdividindo as lectinas em 4 grupos: Lectinas específicas a Glicose e Manose, Lectinas específicas a Galactose e N-acetil-D-galactosamina, Lectinas específicas a L-fucose e Lectinas específicas a Ácidos siálicos (KUMAR et al., 2012), e a classificação com relação a características de suas sequências genômicas, como a sequências de seus motivos lectinicos e a conformação de seus domínios de reconhecimento de carboidratos (TSANEVA; VAN DAMME, 2020).

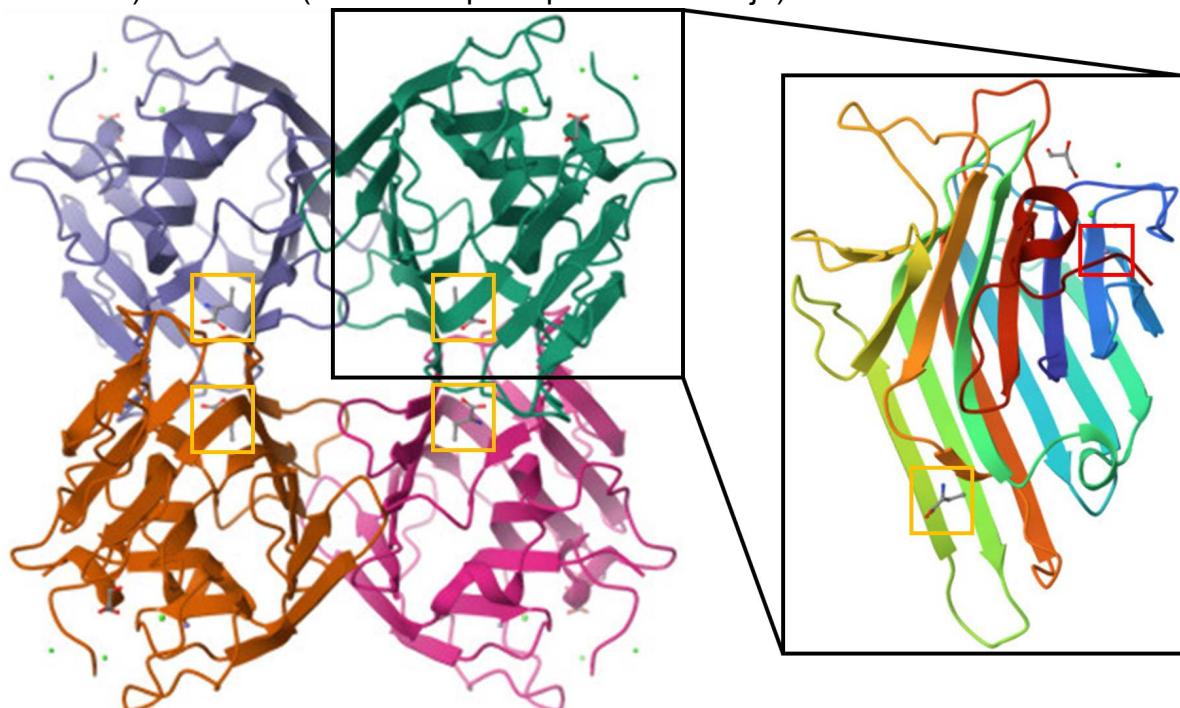
2.3 Lectinas de Leguminosae

Conforme descrito anteriormente, a maior parte das lectinas estudadas são de origem vegetal, e destas, a família Leguminosae (também identificada como Fabaceae) sendo a mais estudada. No entanto, sua importância se estende além deste fato, tendo proporcionado diversos avanços no estudo das lectinas, com destaque para a lectina ConA, proveniente da semente de *Canavalia ensiformis*, que demonstrou a primeira evidência da propriedade de ligação a carboidratos (Summer e Howell, 1936), além de ser a primeira lectina proveniente de plantas a ter as

estruturas primárias e terciárias resolvidas (LÓSSIO, 2016); (VAN DAMME et al., 1998).

Essas lectinas são constituídas de oligômeros de 25 a 30 kDa, com a maioria das proteínas possuindo cerca de 250 aminoácidos, domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC), sítios de ligação de cátions divalentes (Ca^{2+} e Mn^{2+}) e bolsões hidrofóbicos de ancoragem de moléculas hidrofóbicas (LÓSSIO, 2016); (RÜDIGER; GABIUS, 2001); (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017), apresentando alta similaridade em suas estruturas primárias e terciárias, e alta variedade das estruturas quaternárias, afetando a sua especificidade de ligação à glicanos multivalentes (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017), conforme ilustrado na **Figura 2**.

Figura 2: Estrutura geral de lectinas de leguminosae: **A:** Tetrâmero, com DRC's destacados nos quadrados laranjas; **B:** Imagem amplificada de monômero, com destaque ao sítio de ligação de cátions divalentes (área delimitada pelo quadrado vermelho) e ao DRC (delimitado pelo quadrado laranja).



Fonte: Imagem modificada a partir do Protein Data Bank (Banco de dados de proteínas) ("wwPDB: 3JU9", [s.d.])

As lectinas de leguminosas são subdivididas em 2 categorias gerais: Lectinas de subunidades idênticas ou similares e Lectinas com variedade de subunidades (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017).

A especificidade de ligação das lectinas, determinada por ensaios de inibição de atividade hemaglutinante por mono- e oligossacarídeos e glicopeptídeos, provém da existência de um domínio DRC, permitindo a interação com carboidratos de modo não covalente, específico e reversível. Esse domínio é formado por 4 *loops* adjacentes espacialmente, mas distantes na sequência linear, possuindo 4 aminoácidos invariantes participando na ligação a carboidratos, adicionalmente, o DRC se encontra próximo aos sítios de ligação de cátions, podendo auxiliar na ligação de carboidratos de modo não necessariamente direto (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017).

2.4 Lectinas de *Diocleinae*

A subtribo *Diocleinae*, pertencente a subfamília Papilionoideae de Leguminosae, é um grupo que abrange 13 gêneros, com 3 destes sendo os mais conhecidos no estudo de lectinas (*Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea*), iniciando com o isolamento e caracterização da lectina ConA, proveniente de *Canavalia ensiformis*, (LÓSSIO, 2016); (VAN DAMME et al., 1998), outras lectinas desse grupo incluem a lectina ConBr, proveniente de *Canavalia brasiliensis*, (MOREIRA; CAVADA, 1984), dentre outras, conforme ilustrado na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Principais estudos biológicos das lectinas do gênero *Dioclea*

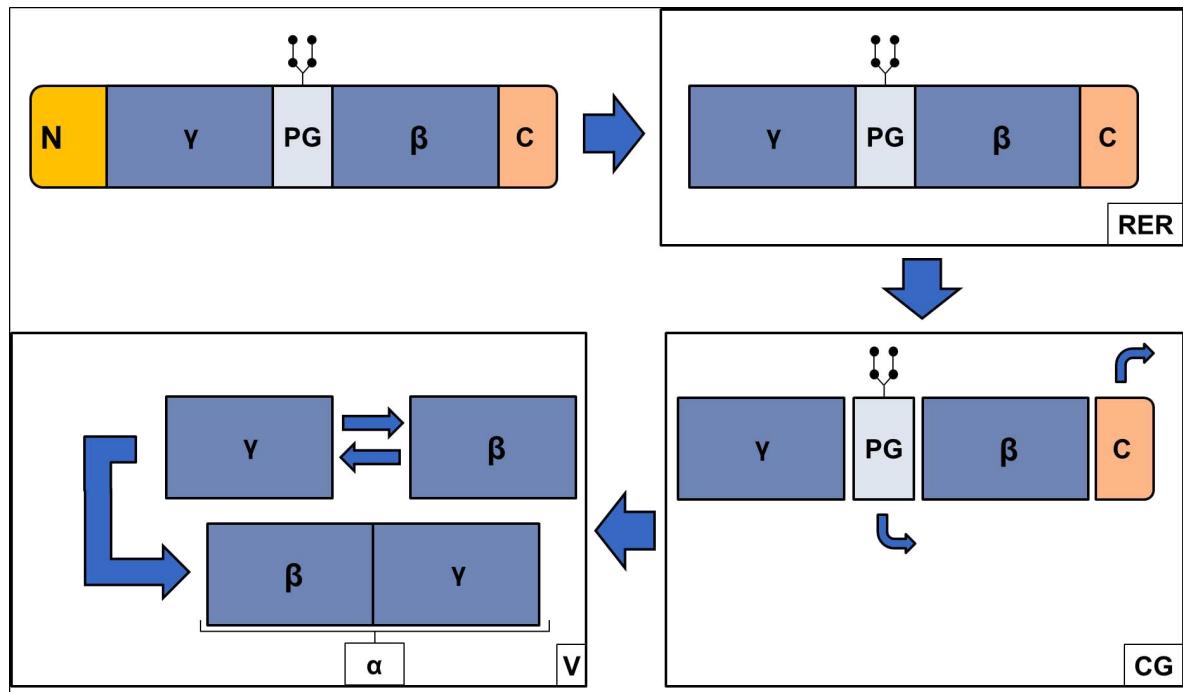
Espécie	Lectina	Estudos	Referências
<i>Dioclea lasiophylla</i>	DlyL	Toxicidade Vasorelaxante	(Pinto-Junior et al. 2016) (Cavada et al. 2022)
<i>Dioclea lasiocarpa</i>	DLL	Antnti-tumoral	(Gondim et al. 2017)
<i>Dioclea reflexa</i>	DrfL	Vasorelaxante Inflamação	(Pinto-Junior et al. 2017) (Pinto-Junior et al. 2016)
<i>Dioclea virgate</i>	DvirL	Anti-Inflamação	(Assreuy et al. 1997)
<i>Dioclea guianensis</i>	Dgui	Anti-fúngica	(Araújo-Filho et al. 2010)
<i>Dioclea grandiflora</i>	DgL	Inflamação	(Lima et al. 1993)
<i>Dioclea rostrata</i>	DRL	Vasodilatador	(Botelho et al. 2021)
<i>Dioclea wilsonii</i>	DwL	Inflamação	(Rangel et al. 2011)

Fonte: Elaborado pelo Autor

Até o presente momento, as lectinas pertencentes a esse grupo apresentam grande similaridade entre si, com relação a características físico-químicas e estruturais, sendo constituídas de monômeros idênticos, que formam estruturas conformacionais dependendo do pH aplicado, além de dependerem de cátions divalentes para exercer atividades biológicas .

Outros aspectos pertinentes dessa classe de lectinas incluem a especificidade primária a D-Glicose e D-Manose (MOREIRA et al., 1991), assim como seu peculiar processo de biossíntese, denominado 'Permutação Circular', descrito, primeiramente, pelo estudo da lectina ConA (BOWLES et al., 1986). Neste processo, a lectina ConA é sintetizada como uma pré-proteína inativa e glicosilada, possuindo peptídeo sinal que a direciona ao retículo endoplasmático, seguido de sua remoção, formando a, ainda inativa, proteína proConA. Em seguida, o oligossacarídeo ancorado a porção central da proConA a direciona ao complexo de Golgi, onde a porção glicosilada de proConA e a região C-terminal são clivadas. Após transporte para o vacúolo, as cadeias restantes β e γ , são transpostas e religadas em posição inversa, finalizando com a remoção de 1 tetrapeptídeo N-terminal, formando a cadeia α madura de ConA (VAN DAMME et al., 1998), conforme ilustrado na **Figura 3**.

Figura 3: Esquema ilustrativo da permutação circular que ocorre durante a biossíntese da lectina ConA: **N:** Peptídeo Sinal e porção N-Terminal, γ : Cadeia γ , **PG:** Peptídeo Glicosado, β : Cadeia β , **C:** Região C-Terminal, **RER:** Retículo Endoplasmático Rugoso, **CG:** Complexo de Golgi, **V:** Vacúolo, α : Cadeia α madura da lectina ConA.



Fonte: Elaborado pelo Autor

Apesar dessas similaridades, as lectinas pertencentes a este grupo possuem variedade com relação a sua afinidade a carboidratos, assim como as atividades biológicas que exercem, resultante de pequenas diferenças no DRC, assim como da oligomerização dependente de pH, presente em algumas das lectinas desse grupo(CAVADA et al., 2018). Desse modo, o estudo de novas lectinas da subtribo *Diocleinae* se torna pertinente não apenas para a sua identificação, mas para contribuir no entendimento de como essas diferenças afetam a relação estrutura-função dessa classe de proteínas.

2.5 *Dioclea megacarpa*

Dioclea megacarpa, conhecida popularmente como mucunã ou ‘Ojo de Buey’, é uma planta encontrada em florestas do México ao Panamá, além de estados do norte e nordeste brasileiros (Amazonas, Pará, Ceará, Maranhão e Piauí),

sendo classificada como uma liana, possuindo ramos cilíndricos com lenticelas, capazes de atingir grandes alturas, apresentando folhas de aspecto oval (“Trópicos”, [s.d.]); (“Flora e Funga do Brasil”, [s.d.]), conforme mostrado na **Figura 4**.

Figura 4: Exsicata de *Dioclea megacarpa*



Fonte: (“HV REFLORA -”, [s.d.])

Adicionalmente, essa espécie possui padrão de inflorescência axilar, produzindo flores de coloração violácea ou roxa, de 20 a 25 mm de comprimento, gerando frutos do tipo vagem, característico de Leguminosae, de aspecto oblongo, podendo atingir 18 cm de comprimento, e semi-deiscente, podendo conter até 5 sementes em seu interior, estas sendo de aspecto suborbicular, com cerca de 2 cm de diâmetro e testa de coloração marrom (“Flora e Funga do Brasil”, [s.d.]), conforme ilustrado na **Figura 5**.

Figura 5: Fruto e sementes de *Dioclea megacarpa*: **A:** Frutos (vagens) de *Dioclea megacarpa* fechados. **B:** Frutos de *Dioclea megacarpa* abertos, exibindo as sementes em seu interior.



Fonte: Elaborado pelo Autor

Trabalhos existentes na literatura relatam do efeito nocivo das sementes dessa espécie sobre possíveis predadores (BATISTA, 2012; JANZEN, 1971), apontando para a existência de substâncias, como as lectinas, responsáveis por essas respostas de defesa, conferindo importância a realização de estudos de purificação (como o presente trabalho) e caracterização dessas substâncias de modo a elucidar esses mecanismos de defesa e, potencialmente, descobrir outras aplicações para elas.

Por fim, a classificação taxonômica da espécie está apresentada a seguir:

Reino: Plantae > **Ordem:** Fabales > **Família:** Leguminosae > **Subfamília:** Papilionoideae > **Tribo:** Phaseoleae > **Subtribo:** Diocleinae > **Genero:** *Dioclea* > **Especie:** *Dioclea megacarpa*

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Realizar a purificação de uma lectina a partir de extratos protéicos das sementes de *Dioclea megacarpa*.

3.2 Específicos

- Obter farinha fina das sementes de *Dioclea megacarpa* por meio de métodos mecânicos e/ou manuais;
- Realizar a extração de proteínas (inclusive lectinas) solúveis em solução salina;
- Realizar ensaios de atividade hemaglutinante com eritrócitos de coelho durante as etapas de purificação da lectina;
- Realizar ensaios de quantificação proteica para averiguar a eficiência do protocolo de purificação estabelecido;
- Purificar a lectina de *D. megacarpa* por meio de cromatografia líquida (afinidade);

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparo de farinha fina das sementes de *Dioclea megacarpa*

A Partir de amostra de 6 sementes de *Dioclea megacarpa* (Ilustradas na **Figura 6**), pesando 52,207g cedidas pelo Professor Doutor Benildo Sousa Cavada, coordenador do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab) da Universidade Federal do Ceará (UFC), foi realizado descascamento das sementes, utilizando pilão de metal, em conjunto com alicate de corte, para remoção do rígido tegumento externo. Em seguida, as sementes foram fragmentadas, utilizando pilão de metal, e direcionadas para trituramento em moinho de café, em pulsos de Trituração, de modo a não aquecer a amostra, seguido por passagem em peneira de trama fina(75 mm), obtendo farinha fina das sementes.

Figura 6: Amostra de sementes de *Dioclea megacarpa* utilizadas no estudo



Fonte: Elaborado pelo Autor

4.2 Extração de proteínas totais solúveis

A extração das proteínas totais solúveis da farinha fina de *Dioclea megacarpa* foi realizada de acordo com outros protocolos existentes na literatura acerca da extração de proteínas de outras espécies do gênero *Dioclea* (Cavada et al., 1997); (PINTO-JÚNIOR et al., 2013), sendo realizada extração em solução de NaCl 0,15M, em proporção de 1:10 (g:mL), a temperatura de 4 a 10 °C em agitador magnético (Fisatom, modelo 752) por 4 horas.

Em seguida, foi realizada centrifugação a 4 °C e 10.414 x g por 20 min e filtragem do sobrenadante obtido em filtro de algodão, obtendo extrato das proteínas totais solúveis das sementes de *Dioclea megacarpa*.

4.3 Ensaio de atividade hemaglutinante

Durante as etapas de purificação da lectinas, foi realizado, em triplicata, ensaio de atividade hemaglutinante, para determinar os títulos de atividade hemaglutinante da lectina e averiguar seu processo de purificação. O ensaio foi realizado conforme protocolos presentes na literatura (OSTERNE et al., 2022), utilizando placas ELIZA e solução-tampão de Tris-HCl 0,1M com NaCl 0,15M, determinando a atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho a 2 % (escolhidos devido a alta compatibilidade com lectinas de outras espécies do gênero *Dioclea*, evidenciada pelos altos títulos de hemaglutinação observados), sendo aplicada alíquota de 50 μ l da amostra (contendo lectina) a 1 mg em 1 ml de solução-tampão de Tris-HCl 0,1 M com NaCl 0,15M, em diluição seriada, nos poços da placa ELIZA, para interagir com solução de 50 μ l de eritrócitos e 50 μ l de solução-tampão, seguido de condicionamento em estufa a 37 °C por 30 min e observação dos títulos de aglutinação formados, definidos pelo maior título que exibe aglutinação visível comparativamente ao grupo controle (sem amostra contendo lectina).

4.4 Atividade hemaglutinante específica

A partir das amostras obtidas ao longo do processo de purificação (extrato total de proteínas solúveis e DmegA purificada por cromatografia de afinidade) foi realizado ensaios de quantificação proteica, de modo a determinar o teor protéico das amostras e averiguar a eficiência do protocolo de purificação estabelecido através da determinação da atividade específica das amostras.

O método de quantificação de proteínas utilizado foi o método descrito por Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando alíquotas de $100\mu\text{l}$ das amostras estudadas, seguido da adição de 2,5 mL do reagente de Bradford, acondicionamento em ambiente escurecido por 15 a 20 min e análise de absorbância a 595 nm, em espectrofotômetro UV-Visível (Amersham Biosciences, modelo Ultrospec 2100 Pro), com a determinação da concentração da concentração protéica sendo realizada através do uso de curva de concentração elaborada por análise com albumina sérica bovina, obtendo a concentração proteica das amostras.

Em seguida, a partir da obtenção deste resultado, e dos resultados dos ensaios de atividade hemaglutinante, foi determinada a atividade específica das amostras, obtida através do cálculo da razão entre o título de atividade hemaglutinante e a concentração proteica observados, conforme descrito na literatura (HIRABAYASHI, 2020), assim como a determinação do fator de purificação resultante, definido pela razão entre a atividade específica do estágio de purificação de interesse e a atividade específica do extrato de proteínas totais e o rendimento total do passo cromatográfico, expresso pelo percentual referente ao teor protéico da amostra obtida após a purificação, considerando o teor protéico do extrato de proteínas totais como equivalente a 100% (BATISTA, 2012).

4.5 Purificação da lectina de *Dioclea megacarpa* por cromatografia de afinidade

A partir do extrato obtido, a lectina de interesse foi purificada através da cromatografia de afinidade, baseando-se em procedimentos relatados na literatura para purificação de lectinas desse gênero (*Dioclea*) ((LÓSSIO, 2016); (Cavada et al., 1997); (PINTO-JÚNIOR et al., 2013)), aplicando alíquota de 30ml de extrato em

coluna contendo 90ml de matriz Sephadex G-50, escolhida devido a sua especificidade em separar moléculas que possuam especificidade de ligação a D-Glicose ou D-manoze, característica comum a várias lectinas do gênero *Dioclea* (Cavada et al., 1997)(PINTO-JÚNIOR et al., 2013), equilibrada com solução de NaCl 0,15M, CaCl₂ 0,005M e MnCl₂ 0,005M, seguido de período de interação entre amostra e matriz por 3 horas.

Em seguida, o material não retido pela coluna (P₁) foi eluído com a solução de equilíbrio, seguido pela aplicação de 0,1M de Glicose, em solução de NaCl 0,15M, CaCl₂ 0,005M e MnCl₂ 0,005M, para eluição do material retido pela coluna (P₂), contendo a lectina de interesse (denominada DmegA), sendo dialisada contra água destilada, em membrana de diálise de 'cutoff' de 5 kDa, exaustivamente, realizando 5 trocas de água a cada 1 hora, e liofilizada.

Durante o procedimento de purificação, os passos cromatográficos foram realizados a fluxo de 2 mL/min e tiveram seu andamento monitorado por leitura de absorbância a 280 nm de frações de 2,5 mL, sendo realizados ensaios de atividade hemaglutinante e atividade hemaglutinante específica das amostras de lectinas obtidas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparo de farinha fina das sementes de *Dioclea megacarpa*

Foi obtida farinha fina proveniente das sementes de *Dioclea megacarpa* a partir de amostra de 6 sementes, pesando 52,207g, cedidas pelo Professor Doutor Benildo Sousa Cavada, coordenador do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas(BioMol-Lab) da Universidade Federal do Ceará (UFC), utilizando-se de metodologia aplicada no estudo de outras lectinas do mesmo gênero (*Dioclea*) (LÓSSIO, 2016; PINTO-JÚNIOR et al., 2013), realizando trituração das sementes em moinho de café, devido a rigidez das sementes, e em pulsos, para evitar possível aquecimento da amostra, sendo obtida, após término do processo de trituramento, 33,1681 g de farinha fina, 63% da massa original das sementes, a partir da amostra de 6 sementes utilizadas.

5.2 Extração de proteínas totais solúveis de farinha das sementes de *Dioclea megacarpa*

A partir da farinha obtida, foi realizada a extração das proteínas solúveis presentes na farinha, baseando-se nos protocolos estabelecidos de purificação de outras lectinas do mesmo gênero (*Dioclea*) da espécie estudada(Cavada et al., 1997; PINTO-JÚNIOR et al., 2013).

As extrações de proteínas realizadas durante a realização do trabalho foram realizadas em amostras de 3g da farinha obtida na etapa anterior, sendo adicionado de 30 mL de solução de NaCl 0,15 M, atendendo proporção de 1:10 (m:v). Após o término do processo de extração, centrifugação e filtragem, foram obtidas as amostras de extrato protéico a serem direcionadas para a cromatografia de afinidade, variando em volume final de 31 a 38mL.

5.3 Ensaios de atividade hemaglutinante

Após a purificação da lectina DmegA por cromatografia de afinidade, foram realizados ensaios de atividade hemaglutinante das amostras obtidas, executados para averiguar a intensidade da atividade exercida pela lectina, além de obter parâmetros comparativos para acompanhar e determinar a eficiência do protocolo de purificação executado.

A partir da realização desse ensaio, foram observados títulos de aglutinação de valor considerável, ilustrados na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Atividade Hemaglutinante de diferentes estágios da purificação da lectina de *Dioclea megacarpa*

Estágio de Purificação	Atividade Hemaglutinante (UH/ml)
Extrato Proteico	32.768
P ₂ de Sephadex G-50 (DmegA)	16.384

Nota: Atividade hemaglutinante expressa unidades de hemaglutinação (UH) por mililitro (mL)

Fonte: Elaborado pelo autor

A partir desses valores, pode-se concluir que, assim como outras espécies do gênero *Dioclea* (Cavada et al., 1997; PINTO-JÚNIOR et al., 2013), *Dioclea megacarpa* possui lectina em suas sementes, apresentando grau considerável de atividade hemaglutinante, com a redução de título observada possivelmente explicada pela redução geral do teor protéico da amostra, necessitando de ensaios adicionais para determinar o teor protéico das amostras e averiguar se a redução observada é devido a redução do teor protéico total, comprovando a eficiência do protocolo estabelecido em purificar a lectina, ou se redução observada é devido a perda da lectina, demonstrando falhas no protocolo utilizado.

5.4 Atividade hemaglutinante específica

Após a realização dos ensaios de atividade hemaglutinante, foi realizado ensaio de quantificação proteica, através da metodologia desenvolvida por Bradford(BRADFORD, 1976), de modo a complementar os resultados obtidos, permitindo o cálculo e obtenção da atividade específica das amostras, definida pela razão entre a atividade hemaglutinante e a concentração proteica(HIRABAYASHI, 2020). Desse modo, a partir desses conceitos e metodologias, foram obtidos os seguintes valores, ilustrados na **Tabela 2**.

Tabela 3 - Estágios de purificação de DmegA

Estágio de Purificação	Atividade Hemaglutinante (UH/mL) ^a	Concentração Proteica (mg/mL)	Atividade Específica (UH/mg) ^b	Fator de Purificação ^c	Rendimento (%) ^d
Extrato proteico	32.768	8	4.096	1	100
P2 de Sephadex G-50 (DmegA)	16.384	0,45	36.408,8	8,88	5,625

Notas: ^a:Atividade Hemaglutinante(AH) expressa por unidades de hemaglutinação(UH/mL)

^b:Atividade específica definida como a razão entre a atividade hemaglutinante e a concentração proteica(HIRABAYASHI, 2020).

^c:Fator de purificação definido como a razão entre a atividade específica do atual estágio de purificação e a atividade específica do extrato de proteínas totais.

^d:Rendimento da etapa de purificação, considerando o teor de proteínas do extrato protéico como 100%(BATISTA, 2012).

Fonte: Elaborado pelo Autor

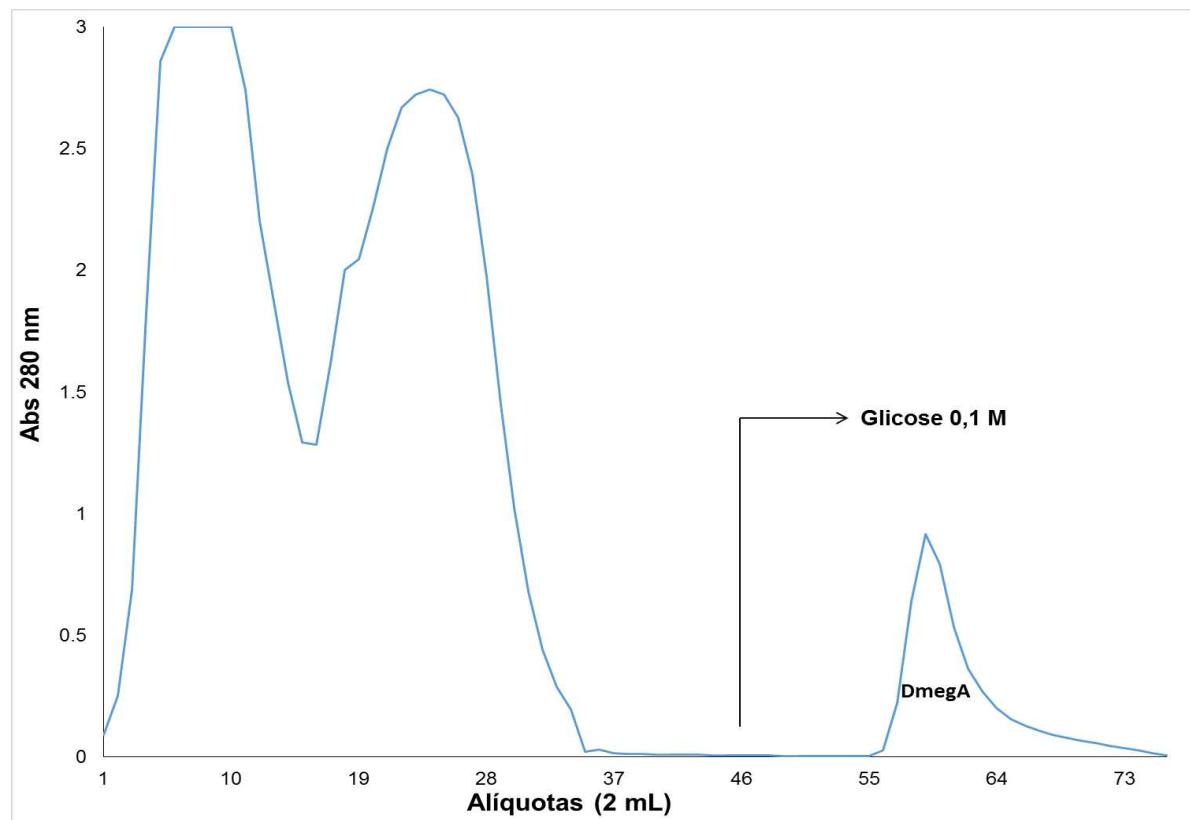
A partir desses valores, pode-se concluir que o protocolo de purificação realizado se mostrou bem sucedido em purificar a lectina de *Dioclea megacarpa* (DmegA), com a amostra obtida após a cromatografia de afinidade exibindo maior atividade específica, em relação ao extrato de proteínas totais, apresentando fator de purificação próximo a 9, significando que o protocolo utilizado foi capaz de obter amostra de DmegA 9 vezes mais pura que o extrato de proteínas totais.

5.5 Purificação da lectina de *Dioclea megacarpa* através de cromatografia de afinidade

A partir das alíquotas de extrato obtidas anteriormente, foram realizadas cromatografias de afinidade de modo a purificar a lectina nele presente. As cromatografias foram realizadas utilizando matriz Sepharose G-50, amplamente utilizada na purificação de outras lectinas do gênero (*Dioclea*) da espécie estudada(Cavada et al., 1997; LÓSSIO, 2016; PINTO-JÚNIOR et al., 2013), devido a especificidade a D-Glicose e D-Manose característica de lectinas desse grupo(MOREIRA et al., 1991).

A partir das cromatografias realizadas foi observada a retenção da lectina na matriz Sepharose G-50, seguida por sua eluição após a adição de solução contendo 0,1M de Glicose (ilustrado na **Figura 7**), oferecendo evidência a sua capacidade de ligação a carboidratos em geral, e a glicose, em particular, estabelecendo a realização de cromatografias nesse tipo de matriz para a purificação da lectina estudada. No entanto, essa interpretação do resultado é de caráter preliminar, sendo necessária a realização de ensaios posteriores, como ensaios de inibição de atividade hemaglutinante (HIRABAYASHI, 2020), para confirmar a especificidade de DmegA a glicose, como outras lectinas do gênero *Dioclea* (Cavada et al., 1997; MOREIRA et al., 1983; PINTO-JÚNIOR et al., 2013).

Figura 7 - Cromatografia de Afinidade (Sephadex G-50) para purificação da lectina de *Dioclea megacarpa*, eluída com solução de NaCl 0,15M, CaCl_2 0,005M e MnCl_2 0,005M para remoção das proteínas não ligantes (Picos de absorbância no início do gráfico), seguido pela obtenção das proteínas que se ligaram a matriz (DmegA) após adição de 0,1M de Glicose a solução de eluente.



Fonte: Elaborado pelo Autor

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi apresentada a purificação de nova lectina proveniente das sementes de *Dioclea megacarpa* (DmegA), realizada a partir de amostra de farinha das sementes, extração das proteínas totais e purificação em passo único de cromatografia de afinidade em matriz de Sephadex G-50, obtendo amostra de pureza quase 9 vezes maior que o extrato de proteínas totais. No entanto, ainda é necessária a realização de ensaios posteriores para confirmar a pureza da amostra obtida pelo protocolo de purificação, como eletroforese SDS-PAGE ou cromatografia de exclusão molecular.

Diante desses resultados, tem-se a perspectiva de realização de novos estudos para a caracterização dessa nova lectina, como especificidade a diferentes carboidratos/glicanos, testes de estabilidade de pH, temperatura e de dependência de metais, assim como sua caracterização estrutural (primária e tridimensional). Ensaios biológicos também serão de suma importância para compreender a relação entre estrutura e função.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AND, H. L.; SHARON*, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition†. 19 mar. 1998.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BATISTA, A. B. Potenciais inseticida e fungicida de sementes de *Dioclea megacarpa* Rolfe. 12 nov. 2012.

BOWLES, D. J. et al. Posttranslational processing of concanavalin A precursors in jackbean cotyledons. **The Journal of cell biology**, v. 102, n. 4, p. 1284–1297, 1 abr. 1986.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). **Science**, v. 119, n. 3091, p. 419, 26 mar. 1954.

CAVADA, B. S. et al. ConA-Like Lectins: High Similarity Proteins as Models to Study Structure/Biological Activities Relationships. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 1, p. 30, 21 dez. 2018.

Flora e Funga do Brasil. Disponível em:

<<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB617062>>. Acesso em: 21 nov. 2023.

HIRABAYASHI, J. (ED.). **Lectin purification and analysis: Methods and protocols**. 1. ed. New York, NY: Springer, 2020.

HV REFLORA -. Disponível em:

<<https://reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/ConsultaPublicoHVUC/ConsultaPublicoHVUC.do?idTestemunho=4563165>>. Acesso em: 7 dez. 2023.

Isolation and characterization of *Dioclea altissima* var. *megacarpa* seed lectin. **Phytochemistry**, v. 46, n. 1, p. 139–144, 1 set. 1997.

JANZEN, D. H. Escape of Juvenile *Dioclea megacarpa* (Leguminosae) Vines from Predators in a Deciduous Tropical Forest. **The American naturalist**, 1 mar. 1971.

KUMAR, K. K. et al. Biological role of lectins: A review. **Journal of orofacial sciences**, v. 4, n. 1, p. 20, 2012.

LAGARDA-DIAZ, I.; GUZMAN-PARTIDA, A. M.; VAZQUEZ-MORENO, L. Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, 12 jun. 2017.

LÓSSIO, C. F. Purificação e caracterização parcial de uma lectina lactose-específica com ação pró-inflamatória de sementes de *Dioclea reflexa*. 2016.

MOREIRA, R. A. et al. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of

Dioclea grandiflora (Mart.). **Planta**, v. 158, n. 1, p. 63–69, jun. 1983.

MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (MART.). isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia plantarum**, v. 26, n. 2, p. 113–120, mar. 1984.

MOREIRA, R. DE A. et al. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 211–218, 1991.

OSTERNE, V. J. S. et al. A galactoside-specific *Dalbergieae* legume lectin from seeds of *Vataireopsis araroba* (Aguiar) Ducke. **Glycoconjugate journal**, v. 40, n. 1, p. 85–95, 26 out. 2022.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as Plant Defense Proteins. **Plant physiology**, v. 109, n. 2, p. 347–352, 1995.

PINTO-JÚNIOR, V. R. et al. Purification, partial characterization and immobilization of a mannose-specific lectin from seeds of *Dioclea lasiophylla* mart. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 10857–10869, 4 set. 2013.

RÜDIGER, H.; GABIUS, H.-J. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate journal**, v. 18, n. 8, p. 589–613, ago. 2001.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R–62R, 30 jun. 2004.

SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F. Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. **Journal of bacteriology**, ago. 1936.

Trópicos. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/13017910>>. Acesso em: 21 nov. 2023.

TSANEVA, M.; VAN DAMME, E. J. M. 130 years of Plant Lectin Research. **Glycoconjugate journal**, v. 37, n. 5, p. 533–551, out. 2020.

VAN DAMME, E. J. M. et al. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical reviews in plant sciences**, 1 nov. 1998.

www.PDB: 3JU9. Disponível em: <<https://doi.org/10.2210/pdb3JU9/pdb>>. Acesso em: 14 dez. 2023.