

**Valberto da Silva Filho**

Faculdade Anhanguera de Anápolis  
valbertosf@hotmail.com

**Wendell Jacinto Pereira**

Laboratório de Química de Proteínas –  
Universidade Federal de Goiás.  
wendell.j.p@hotmail.com

**Kátia Flávia Fernandes**

Laboratório de Química de Proteínas –  
Universidade Federal de Goiás.  
katia@icb.ufg.br

**Karla de Aleluia Batista**

Laboratório de Química de Proteínas –  
Universidade Federal de Goiás.  
karla-batista@hotmail.com



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Endereço: BR-153 – Quadra Área  
75.132-903 – Anápolis – revista.prp@ueg.br

Coordenação:

GERÊNCIA DE PESQUISA

Coordenação de Projetos e Publicações

Recebido em: 01/02/2013

Avaliado em: 20/02/2013

Publicação: 30 de Outubro de 2013

**EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DE  
LECTINAS DE SEMENTES DE *Crotalaria juncea***

Extraction, partial purification and characterization of lectins from  
*Crotalaria juncea* seeds

**RESUMO**

Neste trabalho, sementes de *Crotalaria juncea* foram utilizadas como fonte para a extração e purificação de lectinas. As lectinas extraídas em solução salina apresentaram 896 UH/g de farinha, o que corresponde a uma atividade específica de 312,20 UH/mg proteína. Após a purificação por gel filtração em Sephadex G150, a atividade hemaglutinante aumentou, evidenciando uma purificação de 17,6 vezes. A purificação parcial da lectina foi confirmada por eletroforese SDS-PAGE. A caracterização da lectina frente à seletividade por açúcares evidenciou que a lectina de *C. juncea* apresenta afinidade por lactose e galactose, importante achado no que se refere à aplicação destas lectinas em sistemas de separação de glicoconjugados que contenham lactose ou derivados em sua composição.

**Palavras-Chave:** Lectina; *Crotalaria juncea*; Hemaglutininas; Purificação.

**ABSTRACT**

This work describes the extraction and purification of lectin from *Crotalaria juncea* seeds. The lectin fraction was extracted in saline solution, presenting 896 HU/g flour and 312.20 HU/mg proteins as specific activity. After purification through Sephadex G150 was observed a 17.6-fold purification. The partial purification of the lectin was confirmed by SDS-PAGE. The characterization of sugars specificity of the lectin of *C. juncea* seeds evidenced that it has affinity by lactose and galactose. These results are promising, especially regarding to the application of these lectins in systems for separation of glycoconjugates containing lactose or derivatives in its composition.

**Keywords:** Lectin; *Crotalaria juncea*; Hemagglutinins; Purification

## 1. INTRODUÇÃO

Lectinas são proteínas de caráter não imunológico, com capacidade de reconhecimento específico e de realizar ligação reversível a carboidratos ou compostos contendo carboidratos sem alterar a estrutura covalente das ligações glicosídicas (WONG; CHAN, 2008; CHE et al., 2011). Seu papel biológico está relacionado com a identificação de informações através de ligações de oligossacarídeos, disparando um mecanismo celular específico a esta sinalização. Como exemplos pode-se citar o mecanismo de reconhecimento do óvulo pelo espermatozóide, respostas inflamatórias e a aderência de neutrófilos às células endoteliais dos vasos sanguíneos (ALBERTS et al., 2006). A afinidade das lectinas é usualmente fraca para com os monossacarídeos, com constantes de associação muito baixas, na ordem de milimolar, no entanto, apresentam geralmente elevada seletividade (LIS; SHARON, 1998).

Por se tratar de um grupo diversificado de proteínas, as lectinas têm aplicação bastante ampla, dentre as quais podem ser destacadas a identificação da presença de carboidratos em biopolímeros ou glicoconjugados; cromatografia de afinidade para o isolamento de hormônios, neurotransmissores, imunoglobulinas e compostos relacionados; estudos relacionados à estrutura química de membranas biológicas; contribuição para o esclarecimento das alterações estruturais dos carboidratos de superfície celulares nas transformações malignas; identificação de células tumorais; contribuição na elucidação da estrutura química dos determinantes de grupos sanguíneos ABO, bem como de subgrupos e emprego na microbiologia e parasitologia como instrumento para o reconhecimento celular e diagnóstico (CHE et al., 2011; WONG; CHAN, 2008).

Na natureza, as lectinas são largamente distribuídas nas mais diversas classes de seres vivos, incluindo plantas, algas, fungos, animais (vertebrados e invertebrados) e microorganismos (SANTI-GADELHA et al., 2006; WONG; CHAN, 2008). Dentre as plantas, as famílias Leguminosae e Gramineae são as que apresentam maior número de lectinas isoladas e estudadas (SANTI-GADELHA et al., 2006; PEUMANS et al., 1988).

A crotalaria (Figura 1) é uma leguminosa utilizada na produção de papel, adubação verde (cultivo isolado ou intercalado a culturas perenes), em reformas de canaviais e em rotação com culturas anuais graníferas (FLORES; MIOTTO, 2005). Neste

trabalho foram extraídas, parcialmente purificadas e caracterizadas lectinas de sementes de *Crotalaria juncea*.



**Figura 1.** Vagem de *Crotalaria juncea* e sua semente

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de *C. juncea* (Figura 1) foram coletadas no Campus Samambaia da Universidade Federal de Goiás (Goiânia-GO), trituradas em moinho de facas e peneiradas em tamis de 0,5 mm de abertura. A farinha foi armazenada em frascos hermeticamente fechados e acondicionada em geladeira (4 °C) até o uso.

A extração das lectinas foi realizada segundo metodologia descrita por Silva et al, (2010). 1 g de farinha foi suspensa em 10 mL de solução salina 0,15 mol L<sup>-1</sup>, incubada a 4 °C sob agitação por 1 hora. O material foi centrifugado a 8000 rpm por 15 min e o sobrenadante (extrato bruto) utilizado para os testes de hemaglutinação e dosagem de proteínas totais.

A atividade hemaglutinante foi determinada de acordo com o método descrito por Moreira e Perrone (1977), usando suspensão de hemácias de coelho ou sangue humano tipo O a 2% (v/v) em solução salina 0,15 mol L<sup>-1</sup>. Uma unidade de hemaglutinação foi definida como sendo o inverso da maior diluição de uma dada solução que ainda é capaz de aglutinar uma suspensão de hemácias a 2% (v/v).

A dosagem de proteínas solúveis no extrato bruto e na fração parcialmente purificada foi realizada de acordo com metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando albumina bovina como padrão.

A purificação da lectina extraída foi realizada utilizando-se coluna de gel de filtração de Dextrano-Sephadex G150, com vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. O material foi eluído utilizando-se como fase móvel solução de NaCl 0,15 mol L<sup>-1</sup>. Frações de 1 mL foram recolhidas em tubos de ensaio, suas absorbâncias foram determinadas a 280 nm e as alíquotas que apresentaram leitura foram testadas para atividade hemaglutinante e determinação de proteína total. As frações que apresentaram atividade hemaglutinante foram reunidas, dialisadas, liofilizadas e armazenadas em freezer para testes posteriores.

A pureza da fração contendo lectinas foi indicada pela realização de eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). A corrida foi realizada em amperagem fixa em 40 A e voltagem variável.

Para a caracterização da lectina foram realizados testes de inibição por diversos açúcares, de acordo com metodologia proposta por Moreira e Perrone (1977). A 100 µL de solução 1,0 mol L<sup>-1</sup> do açúcar foi adicionado 100 µL da lectina parcialmente purificada contendo duas unidades de hemaglutinação (UH). Os tubos foram então incubados a 37 °C por 30 minutos e depois deixados em repouso por mais 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período, foi adicionado 200 µL de uma suspensão de hemácias de coelho a 2% (v/v). Os tubos foram incubados a 37 °C por 30 minutos e depois, mantidos à temperatura ambiente por mais 30 minutos. A seguir, o material foi centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos. A especificidade da lectina foi determinada avaliando-se a capacidade de inibição completa da atividade hemaglutinante.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DAS LECTINAS PRESENTES NO EXTRATO BRUTO DE SEMENTES DE *Crotalaria juncea*

As leguminosas são umas das três maiores famílias de plantas, e as sementes pertencentes a essa família possuem um alto teor protéico, apresentando também presença de lectinas. As lectinas presentes nas sementes de *Crotalaria juncea*, a exemplo de outros representantes do gênero *Crotalaria* (PANDO, 2011; KHANG et al., 1990;

REGO, 2002) apresentam atividade hemaglutinante. Os resultados positivos de hemaglutinação foram detectados visualmente através da formação de uma rede ou malha de hemácias no fundo dos tubos. Foram considerados negativos os tubos onde era possível visualizar um compacto homogêneo de células. A interação das lectinas com eritrócitos ocorre devido estes possuírem receptores similares aqueles contra qual a lectina foi desenvolvida, tendo mais de uma função em uma denominada espécie ou tendo função diferente em diferentes espécies (TOMS, 1971).

O extrato bruto apresentou uma atividade hemaglutinante de 224 UH g<sup>-1</sup> farinha, o que corresponde a uma atividade específica de 17,78 UH/mg de proteína. A atividade hemaglutinante específica obtida neste trabalho foi semelhante aos resultados apresentados por Pando et al. (2001), estudando lectinas de *C.paulina*. Além disso, a lectina de *C.juncea* apresentou atividade hemaglutinante específica maior do que a reportada por Khang et al. (1990), que determinou atividade de lectinas em *C. striata*, e Rego et al. (2002), trabalhando com lectinas de *C.pallida*.

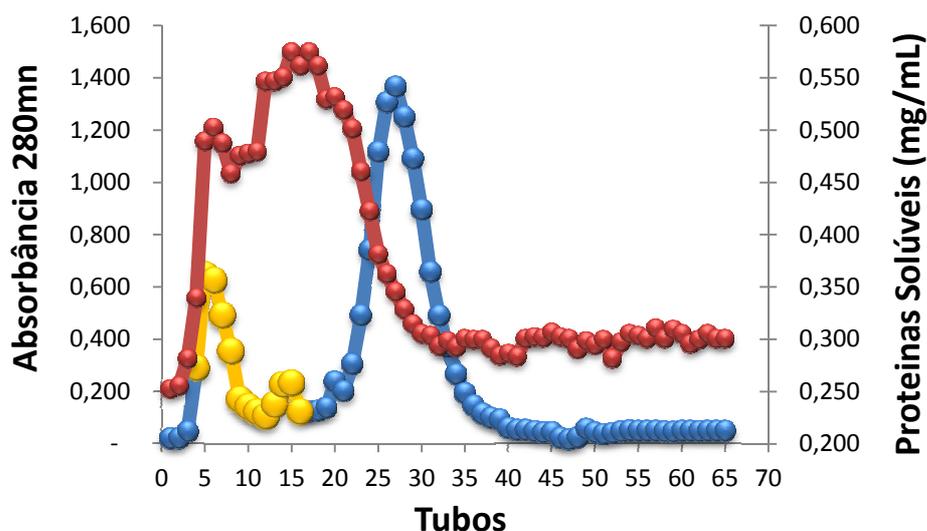
Os resultados encontrados neste trabalho demonstraram que a lectina de *C. juncea* aglutina eritrócitos de coelho e eritrócitos humanos tipo O. O extrato bruto apresentou atividade hemaglutinante de 1816,52 UH mL<sup>-1</sup> quando utilizado eritrócitos humanos tipo O, não tripsinizados. Esse resultado difere dos apresentados por Khang et al. (1990), que trabalhando com *Crotalaria striata*, encontrou uma lectina mono específica, com afinidade apenas por eritrócitos humanos do grupo A.

As lectinas geralmente são glicoproteínas, sendo a porção glicídica das glicoproteínas possui papel crítico em eventos específicos da biologia da célula, sendo que remoção ou alteração da estrutura oligossacardica altera a atividade de algumas glicoproteínas (PANDO, 2001; KHANG et at., 1990; REGO, 2002).

### 3.2. CROMATOGRAFIA POR GEL FILTRAÇÃO

A purificação parcial das lectinas de *C.juncea* foi realizada em Sephadex G150. Este gel possui um intervalo para fracionamento de proteínas entre 100.000-300.000 Da. Como pode ser observado no cromatograma apresentado na Figura 2, a atividade hemaglutinante foi visualizada no primeiro pico, entre os tubos 4 e 16. A validação deste resultado foi realizada por meio de mais 12 cromatografias, e, em todos os

experimentos, o maior título de atividade hemaglutinante sempre foi observado no primeiro pico de fracionamento.



**Figura 2.** Cromatografia em Shepadex G150. Eluição com solução salina 0,15 mol L<sup>-1</sup>. Linha azul representa a absorbância (280nm); linha amarela representa a presença de atividade hemaglutinantes e linha vermelha, quantificação de proteínas solúveis.

A cromatografia por gel filtração promove uma distribuição seletiva das moléculas e de acordo com as propriedades da matriz utilizada, dependendo do tamanho dos poros presentes em tal matriz. Além disso, quando aplicada a uma série homóloga de polímeros, tais como proteínas, podem fornecer um método rápido e útil para estabelecimento da massa molecular e a forma dessas macromoléculas.

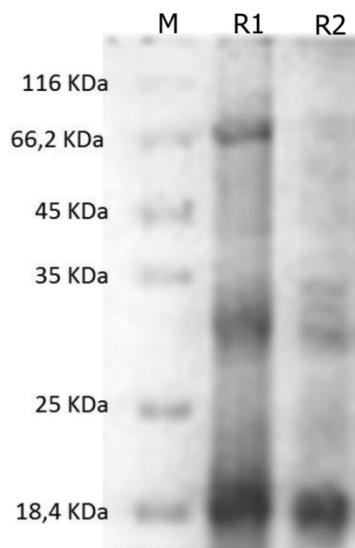
Os tubos dos picos que apresentaram atividade hemaglutinante de todas as corridas cromatográficas realizadas com Shepadex G150 foram reunidos, dializados e liofilizados. O material liofilizado foi ressuscitado e utilizado para a realização da eletroforese e testes de caracterização da afinidade por açúcares.

A fração eluída apresentou atividade hemaglutinante de 896 UH g<sup>-1</sup> farinha. Após a cromatografia em Shepadex G150, houve uma redução de 77% no conteúdo de proteínas, que passou de 12,72 mg mL<sup>-1</sup> no extrato bruto, para 2,87 mg mL<sup>-1</sup> na fração eluída. A redução no conteúdo de proteínas levou ao aumento da atividade hemaglutinante específica (312,20 UH mg<sup>-1</sup> proteína) e resultou em um fator de purificação de 17,6.

### 3.3 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A obtenção de lectinas purificadas é essencial para estabelecimento de suas propriedades moleculares, fisiológicas e possíveis aplicações. Como pode ser observado na Figura 3, a cromatografia em Sephadex G150 proporcionou boa capacidade de separação, entretanto, ao se comparar as bandas presentes no extrato bruto (R1) com o pico da fração Sephadex (R2) é possível verificar apenas uma purificação parcial da lectina de *C. juncea*.

A análise da Raia 2 (Figura 3) permite evidenciar duas bandas distintas, uma de massa molecular maior, entre 25 e 35 KDa e uma fração com massa molecular menor, de aproximadamente 18,4 KDa. Além disso, a fração de maior massa molecular pode sugerir que a lectina de *C. juncea* pode apresentar estrutura trimérica, com uma banda de peso 30,6 KDa, outra de 32,4 KDa e a terceira de aproximadamente 34,2 KDa. A confirmação desta hipótese, entretanto, só seria possível com a realização de uma eletroforese não desnaturante, associada ao gel de atividade, para comparação das bandas.



**Figura 3.** Eletroforese em gel SDS-PAGE 12%. M: Marcadores de peso molecular; R1: extrato bruto de sementes de *C. juncea*; R2: Fração contendo lectina parcialmente purificada proveniente de filtração em Sephadex G150.

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO PURIFICADA

A especificidade da lectina parcialmente purificada foi testada contra os açúcares arabinose, frutose, galactose, glicose, glucosamina, lactose, manose, metil D-glicose,

ribose e sacarose. Dentre os açúcares testados apenas a lactose e galactose foram capazes de inibir a atividade hemaglutinante da lectina na concentração de 1 mol L<sup>-1</sup>.

Todas as células apresentam carboidratos de superfície que podem estar organizados na forma de gliconjugados ou oligossacarídeos. Estes carboidratos servem como sitio de ligação de lectinas e estas ligações podem induzir uma série de alterações celulares que, conseqüentemente, refletem a atividade biológica das lectinas.

As lectinas se conectam aos monossacarídeos de gliconjugados pela cadeia lateral de resíduos conservados de ácido aspártico, asparaginas e aminoácidos aromáticos. A glicina, que é um aminoácido invariante nos sítios de combinação, participa da interação com grupamentos amina de monossacarídeos por interações de hidrogênio. Normalmente, lectinas com especificidade por galactose também interagem com resíduos de n-acetil-glicosamina. Além disso, lectinas ligantes de galactose não apresentam especificidade com glicose (epímero em C4), nem com manose (epímero de glicose em C2) (LIS e SHARON, 1998).

Embora a lectina de *C. juncea* tenha apresentado afinidade por lactose e galactose, outras espécies deste gênero são específicas para outros carboidratos (Tabela 1), como a *Crotalaria pallida*, que apresenta afinidade por D-galactose e D-Rafinose (REGO, 2002); *Crotalaria striata*, que se liga a D-Galactosamina, D-Galactose e N-acetil-D-Galactosamina (KHANG et al., 1990); e *Crotalaria paulina* que possui afinidade por D-Galactose e N-acetil-D-Galactosamina (PANDO, 2001).

Tabela 1 - Análise de afinidade de lectinas purificadas por diferentes carboidratos.

Carboidrato	<i>Crotalaria juncea</i>	<i>Crotalaria pallida</i> (REGO, 2002)	<i>Crotalaria striata</i> (KHANAG et al., 1990)	<i>Crotalaria Paulina</i> (PANDO, 2001)
D - Arabinose	-	-	-	-
D - Galactosamina	nd*	-	+	-
D - Galactose	+	+	+	+
D - Frutose	-	-	-	-
D - Glicose	-	-	-	-
D - Glucosamina	-	-	-	-
D - Lactose	+	-	-	-
D - Manose	-	-	-	-
Metil D-Glicoside	-	-	-	-
N acetil D-Galactosamina	nd	-	+	+
D - Rafinose	nd	+	-	-
D - Ribose	-	-	-	-
D - Sacarose	-	-	-	-

\*nd: não determinado.

As lectinas ligantes de galactose figuram entre uma das mais importantes classes de lectinas, pois apresentam importantes atividades biológicas. Nestas lectinas a ligação com o carboidrato acontece por meio de domínios de reconhecimento de carboidratos específicos. Tais domínios são predominantes de mamíferos, podendo ser encontrados em alguns vertebrados e invertebrados. Entretanto, este tipo de domínio não é comum em plantas. Nas lectinas ligantes de lactose, a unidade de glicose contribui com a ligação por interagir com a proteína através das hidroxilas 2 e 3 (LIS e SHARON, 1998).

#### 4. CONCLUSÕES

A utilização de Sephadex G150 como metodologia de purificação de lectina de sementes de *Crotalaria juncea* originou um material purificado 17,56 vezes, com rendimento de 22,56%. A caracterização da lectina purificada evidenciou capacidade de aglutinação de eritrócitos humanos tipo O e eritrócitos de coelho, sendo inibida a sua atividade na presença de lactose e galactose. Os resultados encontrados permitem sugerir que, a fração parcialmente purificada pode ter aplicação em separação de compósitos que contenham glicoconjugados com resíduos de lactose e galactose.

#### 5. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKEN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular**. Porto Alegre: ARTMED, p. 381-382, 2006.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CHE, A. F.; HUANG, X. J.; XU, Z. K. Polyacrylonitrile-based nanofibrous membrane with glycosylated surface for lectin affinity adsorption. **Journal of Membrane Science** v. 366, p. 272-277, 2011.

FLORES, A. S.; MIOTTO S. T. S. Aspectos fitogeográficos das espécies de *Crotalaria* L.(Leguminosae, Faboideae) na Região Sul do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.19, p. 245-249, 2005.

KHANG, N. Q.; JEAN-LUC, G ; JOHAN H. A blood group A specific lectin from the seeds of *Crotalaria striata*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1033, p.210-213, 1990.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

- LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 637-674, 1998.
- MOREIRA, R.A.; PERRONE, J.C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 59, p. 783-787, 1977.
- PANDO, L. A.; Caracterização físico-química e biológica de proteínas isoladas de sementes de leguminosas: lectinas e inibidores de proteinases. Campinas, São Paulo, 2001.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: Versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, p. 199-229, 1998.
- REGO, E. J. L.; CARVALHO, D.D.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J.C. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox). **Phytochemistry**, v. 60, p. 441-446, 2002.
- SANTI-GADELHA, T. S.; GADELHA, C. A. A.; ARAGÃO, K. S.; OLIVEIRA, C. C.; MOTA, M. R. L.; GOMES, R. C.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; ALENCAR, N. M. N., CRIDDLE, D. ; ASSREUY, A. M. S.; CAVADA, B. S. Purification and biological effects of *Araucária angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, p. 1050-1055, 2006.
- SILVA, M. C.; CORRÊA, A. D.; SANTOS, C. D.; MARCOS, F. C. A.; ABREU, C. M. P.; Extração da lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e o efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v. 30, p. 103-107, 2010.
- TOMS, G.C.; WESTERN, A. Phytoemagglutinins. In: HARBONE, J.B.; BOUTLER, D.; TURNER, B.L. (eds). Chemotaxonomy of Leguminosae. **Academic press**, London, 1971.
- WONG, J. H; CHAN, H Y E. A mannose/glucose-specific lectin from Chinese evergreen chinkapin (*Castanopsis chinensis*) **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, p. 1017-1022, 2008.