

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

PURIFICAÇÃO PARCIAL DE UMA
LECTINA DA RAIZ DE
Guettarda platypoda

VALDENIRA BATISTA DOS SANTOS PÔRTO

Orientadora: Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Recife, 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**PURIFICAÇÃO PARCIAL DE UMA
LECTINA DA RAIZ DE**
Guettarda platypoda

VALDENIRA BATISTA DOS SANTOS PÔRTO

Orientadora: Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Recife, 2003

VALDENIRA BATISTA DOS SANTOS PÔRTO

**PURIFICAÇÃO PARCIAL DE UMA
LECTINA DA RAIZ DE
*Guettarda platypoda***

Dissertação apresentada ao Departamento
de Bioquímica do Centro de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco, UFPE, como requisito para
obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovada por: _____

Recife, 2003

Pôrto, Valdenira Batista dos Santos

Purificação parcial de uma lectina da raiz de *Guettarda platypoda* / Valdenira Batista dos Santos Pôrto. – Recife: O Autor, 2003.

x, 33 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Bioquímica, 2003.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Proteínas 2. Lectinas 3. *Guettarda platypoda* 4. Afinidade cromatográfica I. Título.

**577.112 CDU (2.ed.)
572.6 CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCB – 2007-076**

Ata da defesa de dissertação da Mestranda **Valdenira Batista dos Santos Pôrto**, realizada em 25 de fevereiro de 2003, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 13:00 do dia 25 de fevereiro de 2003, foi aberto, no Auditório Prof. Marcionilo Lins, Depto. de Bioquímica/CCB, o ato da defesa de dissertação da mestranda **Valdenira Batista dos Santos Pôrto**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica. Iniciando os trabalhos, a Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, (Coordenadora do curso supra citado), fez a apresentação da aluna, de sua orientadora, Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, e da Comissão Examinadora composta pelos Professores Doutores: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, na qualidade de Presidente, Vera Lúcia de Menezes Lima, Patrícia Maria Guedes Paiva, os três do Depto. de Bioquímica, e a Profa. Dra. Sandra Rodrigues de Souza, do Depto. de Ciências Biológicas da FAFIRE. Após as apresentações, a Sra. Presidente convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: "**Purificação Parcial de uma Lectina da Raiz de *Guettarda platypoda***", e informou, que de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. A mestranda procedeu a explanação e comentários acerca do tema em 25 (vinte e cinco) minutos. Após a apresentação, a Sra. Presidente concedeu um intervalo de 05 minutos. Reiniciando os trabalhos, a mesma convidou a Comissão para ocupar seus lugares e passou a palavra ao primeiro examinador, Profa. Sandra R. Souza, que após agradecer e fazer alguns comentários, iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita, parabenizando a candidata e sua orientadora. Em seguida, a palavra foi passada para a Profa. Patrícia Maria G. Paiva, que fez alguns agradecimentos e comentários, iniciando sua arguição. Finda a mesma, parabenizou a aluna e sua orientadora. Em seguida, a palavra foi passada para a Profa. Vera Lúcia M. Lima, que fez alguns agradecimentos e iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora parabenizou a candidata e sua orientadora. Prosseguindo, a Sra. Presidente usou da palavra para fazer algumas considerações e agradecimentos à aluna e à Coordenação do Curso de Mestrado em Bioquímica, convidando a Comissão a se reunir na Secretaria do Curso, para proceder o julgamento na presença da Coordenadora. Após alguns comentários, a Comissão decidiu, por unanimidade, conceder a menção "**Aprovada com Distinção**". Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros presentes. Recife, 25 de fevereiro de 2003.

Jose Miron de Oliveira

Vera Lucia M. Lima

Patrícia Maria Guedes Paiva

Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Sandra R. Souza



Jose Miron de Oliveira

Secretário do Curso do

Mestrado em Bioquímica / CCB / UFPE

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas bênçãos recebidas durante toda a minha vida.

À Professora Doutora Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho que me incentivou e alegrou com todo seu entusiasmo, confiança e estímulo durante a realização desse trabalho.

À Professora Doutora Patrícia Maria Guedes Paiva pela amizade, apoio e confiança.

À Professora Doutora Maria Tereza dos Santos Correia pela atenção e apoio.

A todos do Laboratório de Glicoproteínas, pela acolhida, amizade e colaboração em todos os momentos em que necessitei, em especial à Maria Barbosa da Silva Reis pela amizade, apoio e principalmente pela ajuda dada de forma tão generosa durante todas as etapas desse trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica pela amizade e colaboração, em especial a Miron, João, Neide e Djalma.

Aos meus amigos de Mestrado Flávia Fabiany, Graça Paiva, Sílvia Patrícia, Heberty di Tarso, César Augusto, Sérgio André, Melquíades, Janaína e Nadejda, pelo companheirismo e brincadeiras que tornaram todos os momentos, até os mais difíceis, prazerosos e inesquecíveis.

À minha mãe que mesmo à distância me ajudou com seu exemplo de dignidade, bondade, perseverança e força, e ao meu pai, que mesmo não estando aqui, também faz parte de todas as minhas conquistas.

Aos meus irmãos e sobrinhos que torceram por mim e valorizaram cada vitória que conquistei; em especial à minha irmã Valdenice que sempre acreditou em mim e me ajudou durante toda minha vida.

Ao meu marido Miguel pelo estímulo, carinho e compreensão nos momentos difíceis, por estar presente na minha vida e por me apoiar nas minhas decisões e no meu desejo de ser pesquisadora. Obrigado por me fazer feliz.

LISTA DE FIGURAS

v

Figura 1: <i>Guettarda platypoda</i> em seu hábitat	9
Figura 2: Raiz da <i>Guettarda platypoda</i> em seu hábitat	9

LISTA DE TABELAS

VI

Tabela 1: Família de lectinas: ocorrência e especificidade	3
Tabela2: Lectinas de plantas: especificidade de ligação a carboidratos	3
Tabela 3: Importantes aplicações de lectinas de plantas	8

HA: Atividade hemaglutinante

AHE: Atividade hemaglutinante específica

GplaRL: Lectina da raiz da *Guettarda platipoda*

Con A : Lectina de *Canavalia ensiformis*

PHA: Lectina de *Phaseolus vulgaris*

BmoLL: Lectina da folha de *Bauhinia monandra*

Cra iso 1: Isoforma 1 da lectina de sementes de *Cratylia mollis*

SDS: Sulfato sódico de dodecila

PAGE: Gel de poliacrilamida

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IV
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	
1.1 Lectinas	1
1.1.1 Histórico	1
1.1.2 Definição	1
1.1.3 Classificação	2
1.1.4 Ocorrência	4
1.1.5 Papel fisiológico	4
1.1.6 Detecção	5
1.1.7 Purificação e caracterização	5
1.1.8 Aplicações	7
1.1.9 <i>Guettarda platypoda</i>	9
1.1.10 Relevância do trabalho	10
2 OBJETIVOS	
2.1 Objetivo Geral	10
2.2 Objetivos Específicos	10
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
4 ARTIGO “Partial purification of a root lectin from <i>Guettarda platypoda</i> ”	16
5 CONCLUSÕES	33

Lectinas, proteínas ou glicoproteínas que se ligam reversivelmente a carboidratos com diferentes graus de seletividade, são encontradas em uma variedade de organismos e estão envolvidas em numerosos processos celulares. Neste trabalho foi avaliada a presença de lectina(s) em *Guettarda platypoda* D. C., planta conhecida vulgarmente como “angélica”. As raízes dessa planta têm sido utilizadas em medicina popular para o tratamento de diferentes enfermidades. Extratos brutos a 10% (p/v) de raízes íntegras, entrecasca da raiz, folhas, flores, frutos, pecíolos, pedúnculos, caules, ramificação do caule e gemas foram obtidos em NaCl 0,15 M; extratos da entrecasca da raiz foram ainda avaliados em diferentes tampões e valores de pH (citrato-fosfato pH 3,0-7,0; TRIS-HCl pH 7,5-9,0; fosfato de sódio pH 6,0-7,5). Todos os extratos foram submetidos a fracionamento com sulfato de amônio (F 0-60%), diálise e ensaios de atividade hemaglutinante (AH) com diferentes tipos de eritrócitos. Todos os tecidos avaliados apresentaram atividade hemaglutinante; folhas e gemas revelaram as maiores atividades hemaglutinante específicas com eritrócitos glutarizados de coelho. A fração selecionada com a lectina da entrecasca da raiz (GplaRL) foi obtida em tampão citrato-fosfato 0,01 M em NaCl 0,15 M (pH 5,5). AH de GplaRL foi parcialmente inibida com glicose e sacarose. O grau de pureza foi avaliado através de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para proteínas nativas ácidas e em condições desnaturantes/redutoras; foram reveladas duas bandas. GplaRL foi adsorvida em coluna cromatográfica de quitina, levando à obtenção de um pico, o qual revelou uma única banda em PAGE para proteínas nativas ácidas. GplaRL parece ser a primeira lectina mencionada no gênero *Guettarda*.

Palavras-chave: Lectina de raiz; afinidade cromatográfica; *Guettarda platypoda*

Lectins, proteins or glycoproteins that reversibly bind carbohydrates with distinct degrees of selectivity, they are found in a variety of organisms being involved in numerous cellular processes. In this work evaluated the presence of lectin(s) from *Guettarda platypoda* D.C., plant popular known with "angelica". Roots of this plant have been used in folk medicine for treatment of different infirmities. Crude extracts (10%, w/u) in 0.15 M NaCl of roots as a whole, root bark, leaves, flowers, fruits, peduncles, petioles, stems, branches of stems and buds were obtained; root bark extracts were even so evaluated in different buffers and pH values (citrate-phosphate pH 3.0-7.0; TRIS-HCl pH 7.5-9.0; sodium-phosphate pH 6.0-7.5). The extracts were submitted to ammonium sulphate fractionation (F 0-60%), dialyzed and hemagglutinating assays (HA) with different types of erythrocytes. All evaluated tissues showed activity hemagglutinating; leaves and buds revealed the highest HA specific (SHA) with glutaraldehyde rabbit erythrocytes. The selected fraction with root bark lectin (GplaRL) was obtained in 0.001 M citrate-phosphate buffer (pH 5.5) containing 0.15 M sodium chloride. HA was partially inhibited by glucose and sucrose. The purity degree was evaluated through polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) to acidic and native proteins or denatured/reduced polypeptides; two bands were revealed. GplaRL was adsorbed in chromatographic column chitin; one peak was obtained, which revealed one band in PAGE to acidic and native protein. GplaRL seems to be the first lectin mentioned in the genus *Guettarda*.

Keywords: Root lectin; affinity chromatography; *Guettarda platypoda*

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lectinas

1.1.1 Histórico

O primeiro relato a respeito de lectinas ocorreu em 1888, quando Stillmark observou que o extrato bruto de *Ricinus communis* (mamona) continha uma proteína tóxica capaz de aglutinar eritrócitos, a qual foi denominada de ricina (Sharon, 1989). Em 1889, Helin também observou a presença de hemaglutinina tóxica, denominada de abrina, em extratos de *Abrus precatorius*, jequiriti (Sharon e Lis, 1987, Sharon, 1989). Essas descobertas, imediatamente, atraíram a atenção de novos pesquisadores.

No final do século XIX, Paul Ehrlich, trabalhou com uma proteína de *A. precatorius*, com propriedades semelhantes a ricina e introduziu as lectinas nos estudos imunológicos (Sharon, 1989; Kennedy, 1995) permitindo grandes avanços nessa área. A descoberta (1960) que as lectinas promovem estimulação mitogênica de linfócitos e inibição do crescimento de células tumorais (Lis e Sharon, 1986) fez dessas biomoléculas uma ferramenta largamente utilizada nos estudos citoquímicos e histológicos. Na última década, fatores que são importantes para ligação da lectina com os carboidratos foram melhor elucidados.

1.1.2 Definição

O termo lectina, do latim “*lectus*” (selecionado), generalizado por Sharon e Lis (1972) inclui proteínas ou glicoproteínas de origem não-imune. As lectinas possuem pelo menos um sítio não catalítico, que se ligam específica e reversivelmente a mono ou oligossacarídeos, livres ou em superfícies celulares; a hidrofobicidade é a principal força de interação (Kennedy, 1995; Sharon e Lis, 2001).

1.1.3 Classificação

Análises detalhadas de centenas de lectinas mostram a heterogeneidade desse grupo de proteínas que diferem quanto à especificidade, estrutura molecular e atividade biológica (Peumans e Van Damme, 1996).

Vários critérios são utilizados para classificar as lectinas. Quanto à especificidade, que é definida em função do monossacarídeo que mais eficazmente inibe a atividade lectínica (Kennedy *et al.*, 1995). As lectinas de plantas podem ser classificadas em: grupo manose, grupo fucose, grupo galactose/N-acetilgalactosamina, grupo N-acetilglicosamina, grupo ácido siálico, e grupo glicanos complexos mostrados na tabela 1 (Peumans e Van Damme, 1998a).

Quanto à sua estrutura molecular, as lectinas foram classificadas em: merolectinas, proteínas que apresentam um único sítio ligante para carboidratos, como a haveína, incapazes de aglutinar células ou de precipitar glicoconjugados, devido à sua natureza monovalente. As hololectinas, proteínas que apresentam exclusivamente domínio de ligação a carboidratos, todavia, possuem dois ou mais sítios de ligação que podem idênticos ou homólogos. As lectinas que aglutinam células ou precipitam glicoconjugados fazem parte deste grupo, que compreende a maioria das lectinas de plantas, tal como a lectina de sementes de *Canavalia ensiformis*, a Concanavalina A (Con A). As quimerolectinas são proteínas que possuem além do domínio ligante a carboidratos, outro domínio com atividade catalítica ou outra atividade biológica que independe do domínio ligante do carboidrato, como a quitinase 1. As superlectinas são um grupo especial de quimerolectinas; são proteínas de fusão com dois domínios de ligação a carboidratos, os quais são estruturalmente diferentes e reconhecem carboidratos distintos (Peumans e Van Damme, 1998a). A Con A reconhece glicose e manose, assim como a isolectina 1 da lectina de sementes de *Cratylia mollis*, Cra Iso 1 (Beltrão *et al.*, 1998), já a lectina extraída de sementes de *Bauhinia purpurea* reconhece N-acetilgalactosamina, enquanto que a lectina extraída de folhas de *Bauhinia monandra*, BmoLL, reconhece galactose, rafinose e metil- β -D-galactopiranosídeo (Coelho e Silva, 2000).

Tabela 1. Famílias de lectinas de plantas: ocorrência e especificidade

GRUPO	ESPECIFICIDADE	LECTINA
Fucose	Fucose	<i>Ulex europaeus</i> aglutinina I
N-acetilglicosamina	GlcNac	<i>Triticum aestivum</i> (gérmen de trigo)
Galactose/N-acetilgalactosamina	Galactose >> GalNac	<i>Artocarpus integrifolia</i> (Jacalina)
	Gal = GalNac	<i>Clerodendron trichotomum</i>
	Gal << GalNac	<i>Glycine max</i> (feijão de soja-Soybean)
Manose	Manose/Glicose	<i>Cratylia mollis</i>
		<i>Canavalia ensiformis</i> (Con A)
	Manose/Maltose	<i>Calystegia sepium</i>
	Manose	<i>Galanthus nivalis</i>
Glicano complexo	Glicoproteína	<i>Phaseolus vulgaris</i> (PHA)

As lectinas de plantas podem ser, ainda, agrupadas de acordo com a relação evolucionária e estrutural (Tabela 2), em sete famílias; as mais numerosas são aquelas isoladas de legumes e as ligadoras de quitina (Peumans e Van Damme, 1998a).

Tabela 2. Famílias de lectinas de plantas: ocorrência e especificidade

Família	Ocorrência (nº de lectinas identificadas)	Especificidade
Legumes	>100	Manose/glicose Fucose Gal/GalNac (GlcNac) _n Ácido Siálico Complexos
Ligadoras de quitina	>100	(GlcNac) _n GlcNac
Ligadoras de manose de monocotiledôneas	>50	Manose
Cucurbitaceae	<10	(GlcNac) _n
Amaranthaceae	<10	GlcNac
Jacalina	<10	Gal/GalNac Manose/maltose
RIP Tipo 2	>20	Siaα2-6Gal/GalNac

Gal, galactose; GalNac, N-acetilgalactosamina; GlcNac, N-acetilglicosamina; Sia, ácido siálico.

1.1.4 Ocorrência

As lectinas têm distribuição ampla na natureza; são encontradas em microorganismos, animais e plantas (Coelho e Silva, 2000; Wang *et al.*, 2000). As principais fontes de lectinas são as sementes de leguminosas, chegando a constituir até 10% da proteína total (Spilatro *et al.*, 1996). A quantidade presente em sementes pode variar bastante, em alguns constituem 2% do peso seco (Rudiger *et al.*, 1998). As lectinas podem ser encontradas em diferentes tecidos vegetativos como raízes, vagens, bulbos, folhas, frutos e até mesmo cascas (Wu *et al.*, Coelho e Silva, 2000; Ratanapo *et al.* 2001; Oliveira *et al.*, 2002). Lectinas algumas vezes existem como uma mistura complexa em uma única localização dentro da planta (Van Damme, 1995; Coelho e Silva, 2000), como também diferentes tecidos de uma planta podem conter uma única lectina (McPherson *et al.* 1987; Coelho e Silva, 2000).

1.1.5 Papel fisiológico

Apesar dos numerosos estudos sobre a especificidade e estrutura das lectinas de plantas, as funções biológicas dessas biomoléculas continuam sob especulação (Durverger *et al.*, 1997). Várias funções têm sido propostas para as lectinas das cascas de árvores e sementes, como: ação antifúngica, antiviral, inseticida, e reserva. As lectinas podem estar envolvidas no reconhecimento celular, como por exemplo, na simbiose legume/*Rhizobium* (Ho e Kjne, 1991), estoque de proteínas (Van Damme *et al.*, 1997), e na proliferação e crescimento celular das plantas (Wittsuwannakul *et al.*, 1997). Às proteínas da entrecasca tem sido atribuído papel importante no metabolismo do nitrogênio de árvores de regiões temperadas (Van Damme, 1995).

Em animais, evidências sugerem que as lectinas participam do mecanismo de endocitose, transporte intracelular de glicoproteínas, apoptose, defesa contra microorganismos, e da regulação da migração e adesão celular (Rudiger *et al.*, 2000).

As lectinas de vírus possivelmente estão envolvidas na ligação entre o vírus e a superfície celular de eritrócitos ou outras células, através do reconhecimento do ácido N-acetil neuramínico, presente na referida superfície celular (Singh *et al.*, 1999); as lectinas de fungos têm seu papel desconhecido (Kawagishi *et al.*, 2001). As lectinas ligam bactérias e parasitas à células hospedeiras (Oka *et al.*, 1997; Hirsch, 1999).

1.1.6 Detecção

A detecção da presença de lectinas em uma fonte biológica é realizada através de ensaio de hemaglutinação (Sharon e Lis, 2001), o qual consiste em diluição seriada da lectina, seguida de incubação com eritrócitos (Coelho e Silva, 2000). A presença de lectina é confirmada através de ensaio de inibição da atividade hemaglutinante, utilizando uma solução do carboidrato, baseando-se na capacidade das lectinas se ligarem a monossacarídeos livres ou conjugados (Cavada *et al.*, 2000). Em ambos os ensaios são utilizados eritrócitos de diferentes espécies animais, que podem ser frescos, tratados enzimaticamente (tripsina, papaína) ou quimicamente por glutaraldeído ou formaldeído (Correia e Coelho, 1995; Coelho e Silva, 2000).

1.1.7 Purificação e caracterização

O primeiro passo para a purificação de lectinas em uma fonte biológica é a preparação de extratos em solução salina ou diferentes tampões. Os extratos que apresentam atividade lectínica podem ser parcialmente purificados por fracionamento salino seguido de diálise exaustiva (Kennedy, 1995; Coelho e Silva, 2000). A solubilidade da proteína em solução salina é dependente do tipo de íons e da concentração do sal (Kennedy *et al.*, 1995).

Muitas purificações têm sido feitas por reprecipitação das frações em diferentes concentrações salinas. O sulfato de amônio é freqüentemente utilizado para precipitar proteínas com elevada força iônica. Esse sal pode precipitar proteínas enquanto estabiliza sua estrutura nativa, já que as forças

hidrofóbicas são reforçadas e a tendência da água expelir a proteína é aumentada. Alguns íons como I^- , Li^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Ba^{2+} aumentam a solubilidade da proteína; esses íons também podem ser desastrosos, porque suas habilidades podem romper as interações hidrofóbicas (Kennedy *et al.*, 1995).

Convencionalmente são utilizadas técnicas cromatográficas para a purificação como a cromatografia de troca iônica, gel filtração (Ratanapo *et al.*, 2001) e cromatografia de afinidade, que se caracterizam pela distribuição de moléculas a serem separadas através de duas fases, uma estacionária e outra móvel.

A cromatografia de afinidade é a mais poderosa técnica de purificação de lectinas. Desenvolvida por Cuatrecasas *et al.* (1968) se baseia na propriedade das lectinas de se ligarem específica e reversivelmente a carboidratos (Kennedy *et al.*, 1995). As lectinas possuem a vantagem de não se modificarem com os compostos com os quais interagem e a ligação é reversível por não ser tão forte (Lis e Sharon, 1981b). Diferentes matrizes são escolhidas de acordo com a especificidade da lectina por carboidratos, a qual é definida através de ensaios de inibição da atividade hemaglutinante, utilizando monossacarídeos ou carboidratos complexos.

Na cromatografia de afinidade a solução contendo uma mistura de proteínas é passada através da coluna cromatográfica; a proteína de interesse se liga à matriz, sendo as demais substâncias eluídas completamente pela adição de uma solução tampão. Uma vez presa ao suporte, a proteína será recuperada na sua forma pura através da modificação das condições de eluição (Ye e Ng, 2002). Geralmente a lectina é eluída da coluna pela passagem da solução contendo o monossacarídeo competidor (Correia e Coelho, 1995).

Lectinas específicas para glicose/manose e seus derivados podem ser purificadas utilizando polissacarídeos, como os géis de dextranas, comercialmente disponíveis, como Sephadex (Koshte *et al.*, 1990). Aquelas com especificidade para galactose e seus derivados têm sido purificadas por colunas utilizando géis de agarose, comercializados como Sepharose (Peumans *et al.*, 1996) e a goma guar (Moraes *et al.*, 1996). As lectinas específicas para N-acetil-D-glicosamina e seus oligossacarídios, derivados de

quitina, podem utilizar como suporte de afinidade a quitina (Shibuya *et al.*, 1986).

Através de técnicas eletroforéticas pode-se caracterizar as lectinas, determinando-se seu peso molecular aproximado e seu ponto isoelétrico. A eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas nativas (sob condições não desnaturantes) permite analisar o grau de pureza da proteína (Nemoto e Sato, 1998). O método eletroforético utilizado para a determinação da pureza e da massa molecular de subunidades protéicas utiliza sulfato sódico de dodecila e β -mercaptoetanol (Machuca *et al.*, 1999; Pajic *et al.*, 2002). Após a corrida eletroforética as proteínas são visualizadas pela adição do corante azul de Coomassie (Coelho e Silva, 2000).

1.1.8 Aplicações

Lectinas purificadas de plantas têm sido usadas em biotecnologia como ferramenta de pesquisa e como proteínas bioativas (Tabela 3). O amplo interesse em lectinas de plantas está diretamente relacionado à sua elevada interação com carboidratos e aos seus efeitos biológicos. O grande impacto das lectinas de plantas na pesquisa biológica e biomédica se deu por duas razões: as lectinas de plantas são fontes facilmente acessíveis de proteínas ligantes de carboidratos e são particularmente completas para a análise e isolamento de glicoconjugados humanos e animais (Peumans, 1998b)

Lectinas de plantas têm sido usadas classicamente como ferramenta analítica na pesquisa de glicoproteínas, e como uma proteína bioativa para a indução de vários processos celulares (Peumans, 1998b) como aglutinação de eritrócitos (Paiva e Coelho, 1992; Coelho e Silva, 2000) e liberação de óxido nítrico por macrófagos (Andade *et al.* 1999). São utilizadas na avaliação de superfícies celulares, tipagem sanguínea (Mo *et al.*, 2000), como moléculas bioadesivas na produção dos chamados medicamentos-inteligentes (Gabor *et al.*, 2001) e como marcadores de tecidos tumorais (Beltrão *et al.*, 1998). O recente progresso da pesquisa em lectinas de plantas, especialmente no que diz respeito ao entendimento da estrutura/especificidade/função, relacionado a

diferentes grupos dessas proteínas, refina e estende essas aplicações (Peumans, 1998b).

As lectinas são bastante conhecidas como ativadoras de linfócitos, as quais são chamadas de lectinas mitogênicas, e na indução da síntese de proteínas específicas como enzimas, citocinas e interleucinas (Kilpatrick, 1991). Poucas lectinas, como a Con A e PHA são exploradas completamente para promover reações celulares específicas (Peumans, 1998b). A Con A tem sido imobilizada em Sepharose e rotineiramente usada na separação e purificação de glicoproteínas, polissacarídeos e glicolipídios (Hong *et al.*, 2001)

Tabela 3. Importantes aplicações de lectinas de plantas

I. Na pesquisa

A. Como ferramentas

Detecção de glicanos específicos
Isolamento de glicoconjugados
Caracterização de glicanos

B. Como proteínas bioativas

Indução de mitoses
Indução de proteínas específicas ou processos celulares

II. Aplicações biomédicas

A. Diagnóstico

Tipagem de grupos sanguíneos
Detecção de erros nas glicosilações de glicoproteínas
Marcação histoquímica de carboidratos
Estimulação de linfócitos para análises cromossômicas

B. Terapêutico

Imunomodulação
Terapia do câncer com imunotoxinas

III. Proteção nas plantas

Como fator de resistência contra predadores

De acordo com Peumans e Van Damme (1998b)

As lectinas são valiosas ferramentas para investigação estrutural de carboidratos complexos, especialmente glicoproteínas e para análise de mudanças que ocorrem sobre a superfície celular durante os processos fisiológicos e patológicos, desde células normais até células transformadas no câncer (Sharon e Lis, 2001).

Muitas lectinas de plantas, as quais também têm atividade biológica para várias aplicações, talvez até superiores às lectinas clássicas, não são usadas

ou somente em escala muito baixa. Por isso, futuras confirmações das atividades biológicas de lectinas descobertas no passado, como daquelas mais recentes, de diferentes tipos celulares, eventualmente irão guiar aplicações ainda desconhecidas (Peumans,1998b).

1.1.9 *Guettarda platypoda*

Guettarda platypoda é uma planta da família Rubiaceae, conhecida vulgarmente como Angélica ou Angélica Brava, que se encontra depositada no Herbário do IPA (Instituto de Pesquisa Agronômica de Pernambuco).

É uma planta de flores brancas e aromáticas, com frutos em drupa globosa, pequena e em coroa, que fornece madeira para pequenas obras de construção civil e é excelente para a marcenaria. A casca do caule, e principalmente a raiz, bem como o lenho desta, são aromáticas, tônicas estomacais e febrífugas. É também usada na medicina veterinária como febrífuga e adstringente, eficaz na cura de diarreia dos bovinos e eqüinos. É encontrada do Piauí à Bahia, Minas Gerais e São Paulo (Corrêa,1985).

Uma revisão feita por Muller Argonvensis mostrou a presença de 15 espécies de *Guettarda* no Brasil. Hoje cerca de 22 espécies já são conhecidas e o estudo, do seu habitat, sinônimo e distribuição, está sendo realizado (Barbosa, 1999).



Figura 1: *Guettarda platypoda* em seu habitat



Figura 2: Raiz da *Guettarda platypoda* em seu habitat

1.1.10 Relevância do Trabalho

O Laboratório de Glicoproteínas do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco tem como principais objetivos a busca por novas fontes e formas moleculares de lectinas, bem como o isolamento, caracterização e aplicação dessas lectinas na área Biotecnológica.

A *Guettarda platypoda* é uma espécie autóctone de ampla distribuição no litoral brasileiro. A sua raiz é conhecida como raiz dos farmacêuticos e curandeiros, muito utilizada na medicina popular na forma de chá, xarope e infusos para o tratamento de diferentes males, como cefaléia, febre, resfriados, “dores no corpo”, bronquite, “limpeza pós-parto”, entre outros.

O seu uso amplo e contínuo em estados inflamatórios e virais, torna necessário e de vital importância a investigação de constituintes protéicos com atividade lectínica, uma vez que as lectinas estão envolvidas em uma variedade de processos celulares, como os inflamatórios e imunológicos.

Essa planta já vem despertando interesse na área da fitoquímica, exatamente pelo seu uso popular em estados febris, com uma gama de compostos já isolados (Aquino *et al.*, 1987). Esses conhecimentos somados à área da bioquímica podem contribuir para um melhor aproveitamento do potencial dessa espécie na área biomédica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Purificação parcial de lectina da *Guettarda platypoda*.

2.2 Objetivos Específicos

- Detectar a presença de lectina em preparações diversas de *G. platypoda*;
- Definir o melhor protocolo de purificação parcial da lectina previamente detectada;
- Identificar o padrão da preparação contendo a lectina em eletroforese para proteínas nativas em condições desnaturantes e redutoras.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, J. L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M. V.; BARRAL-NETO, M. Lectin-induced nitric oxide production. **Cell Immunology**, v. 194, p. 98-102, 1999.

AQUINO, R.; SIMONE, F.; PIZZA, C.; CERRI, R.; MELLO, J. F. Quinovic acid glycosides from *Guettarda platypoda*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 9, p. 2927-2930, 1988.

BARBOSA, M. R. V. Synopsis of the genus *Guettarda* (*Rubiaceae: Guettardeae*) in Brazil. **XVI International Botanical Congress**, Abstrac Number 2283, 1999.

BELTRÃO, E. I. C.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, J. F.; COELHO, L. C. B. B. Binding evolution of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to mammary human tissues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 74, p.125-134, 1998.

CAVADA, B. S.; MADEIRA, S. V.; CALVETE, J. J.; SOUZA, L. A.; BOMFIM, L. R.; DANTAS, A. R.; LOPES, M. C.; GRANGEIRO, T. B.; FREITAS, B. T.; PINTO, V. P.; LEITE, K. B.; RAMOS, M. V. Purification, chemical and immunochemical properties of a new lectin from *Mimosaideae* (*Parkia discolor*). **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 30, p. 271-280, 2000.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 1-6, 2000.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de Plantas úteis do Brasil e as Exóticas Cultivadas**, v. 1, p. 117, 1985.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of glucose/manose specific lectin, isoform 1, from seeds, from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, p. 261-273, 1995.

DUVERGER, E.; DELMOTTE, F. M. Purification of lectins from *Robinia pseudoacacia* L. root-tips. **Plant Science**, v. 23, p. 9-18, 1997.

GABOR, F.; KLAUSEGGER, U; WIRTH, M. The interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Der-145. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p. 35-47, 2001.

HIRSCH, A. M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 320-326, 1999.

HO, S. C.; KIJNE, J. W. Lectins in *Rhizobium*-legume symbiosis. In: D. C. KILPATRICK, E. VAN PRIENECHÉ AND T. C. BOG. HANSEN (Eds.) **Lectins Reviews**, Sigma, St. Louis, MO, p. 171-181, 1991.

HONG, M.; CASSELY, A.; MECHREF, Y.; NOVOTNY, M. V. Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v. 752, p. 207-216, 2001.

KAWAGISHI, H.; TAKAGI, J.; TAIRA, T.; MURATA, T.; USUI, T. Purification and characterization of a lectin from a mushroom *Mycophlebotomoides aitchisonii*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 53-58, 2001.

KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M. e COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-230, 1995.

KOSHTE, V. L.; VAN DIJK, W.; VAN DER, M. E.; AALBERSE, R. C. Isolation and characterization of Ban Lec-1, a monnoside-binding lectin from *Musa paradisiacal* (banana). **Biochemical Journal**, v. 272, p. 721-726, 1990.

LIS, H.; SHARON, N. Biological properties of lectins. In: **The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine**. London: Academic Press, p. 265-285, 1986.

MACHUCA, J. S.; OREOLA, O. G.; VAN DAMME, E. J. M.; CHRISPPEELS, M. J.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J. Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African Yam beams, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. **Phytochemistry**, v. 51, p. 721-728, 1999.

MCPHERSON, A.; HANKINS, C. N.; SHANNON, L. Preliminary x-ray diffraction analysis of crystalline lectins from the seeds and leaves of *Sophora japonica*. **Journal of Biochemistry**, v. 262, p. 1791-1794, 1987.

MO, H.; WINTER, H. C. GOLDSTEIN, I. J. Purification and characterization of a new 5Ac alpha2-6Galbeta1-4Glc/GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 10623-10629, 2000.

MORAES, S. M. D.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; SANTOS-DE-OLIVEIRA, R.; PINTO, V. P. T.; OLIVEIRA, J. T. A. Purification physicochemical, characterization and biological properties of a lectin from *Eryrina velutina*, forma *auratiaca* seeds. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 249, p. 190-192, 1998.

NEMOTO, T.; SATO, N. Analysis of submit structures of proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 265, p. 190-192, 1998.

OKA, Y.; CHRT, I.; SPIEGEL, Y. Accumulation of lectins in cereal roots invaded by the cereal cyst nematode *Heterodera avenae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.51, p. 333-345, 1997

OLIVEIRA, J. T. A.; MELO, V. M. M.; CÂMARA, M. F. L.; VASCONCELOS, I. M.; BELTRAMINI, L. M.; MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M.; PEREIRA, S. P.; FERNANDES, C. F.; NUNES, E. P.; CAPISTRANO, G. G. G.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 301-310, 2002.

PAJIC, I.; KLJAJIC, Z.; DOGOVIC, N.; SLADIC, D.; JURANIC, Z.; GASIC, M. J. A novel lectin from sponge *Haliclona cratera*: isolations, characterization and biological activity. *Comparative Biochemistry and Biological activity. Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 132, p. 213-221, 2002.

PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: Specific Tools for the Identification, Isolation, and Characterization of O-linked Glycans. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33(3), p. 209-258, 1998a.

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. 199-228, 1998b.

PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, E. J. M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. In: **Trends in Food, Science & Technology**, v. 7, p. 132-138, 1996.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHVLAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringal pv mori*. **Plant Science**, v. 160, p. 739-744, 2001.

RÜDIGER, H. Plant lectins-more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Acta Anatomica (Basel)**, v. 161, p. 130-152, 1998.

RUDIGER, H.; SIEBERT, H. C.; SOLIS, D.; JIMENEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; VON DER LIETH, C. H.; DIAZ-MARINO, T.; GABIOS, H. J. Medical chemistry based on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. **Current Medical Chemistry**, v. 7, p. 389-416, 2000.

SHARON, N. A centenary of lectins: impact on immunology. In: **Cellular Basis of Immune Modulation**. London: Alan R. Liss, p. 609-619, 1989.

SHARON, N. e LIS, H. The structural bases for carbohydrate recognition by lectins. In: Wu, A. M. **The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2**. Taiwan: Kluwer Academic Plenum Publishers, p. 1-9, 2001.

SHARON, N. LIS, H. A century of lectin research (1888-1988). **Trends in Biochemical Sciences**, v. 12, p. 488-491, 1987.

SHIBUYA, N.; SHAFER, J. A.; PEUMANS, W. J.; BROEKAERT, W. F. Carbohydrate binding properties of the stinging nettle (*Urtica dioica*), rhizome lectin. **Archives of Biochemistry and Biophysic**, v. 249, p. 215-224, 1986.

SINGH, R. S.; TIWARY, A. K.; KENNEDY, J. F. Lectins: Saucers and applications. **Critical Reviews in Biotechnonology**, v. 19, p. 145-178, 1999.

SPILATRO, S. R.; COCHRAN, G. R.; WALKER, R. E.; CABLISH, K. L.; BITTNER, C. C. Characterization of a new lectin of soybean vegetative tissues. **Plant Physiology**, v. 110, p. 825-834, 1996.

VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; BEMER, V.; ROUGÉ, P.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J. A lectin and a lectin-related protein are the two most prominent proteins in the bark of yellow wood (*Cladastis lutea*). **Plant Molecular Biology**, v. 29, p. 579-598, 1995.

WANG, H.; GAO, J.; NG, T. B. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from oyster mushroom *Pleurotus ostreus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 275, p. 810-816, 2000.

WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D.; SAKULBORIRUG, C. A lectin from the bark of the rubber tree (*Haurea brasiliensis*). **Phytochemistry**, v. 47, p. 183-187, 1998.

WU, A. M.; WU, J. H.; TSAI, M. S.; HERP, A. Carbohydrate specificity of a agglutinin isolated from the root of *Trichosanthes kirilowii*. **Life Sciences**, v. 66, p. 2571-2581, 2000.

YE, X. Y. & NG, T. B. Isolation of a new cyclophilin-like protein from chickpeas with mitogenic, antifungal and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities. **Life Science**, v. 70, p. 1129-1138, 2002.

4 Artigo a ser submetido ao periódico **Bioresource Technology**

Partial purification of a root lectin from
Guettarda platypoda

PÔRTO, V. B. S.; SILVA, M. B. R. & COELHO, L. C. B. B.

Partial purification of a root lectin from

Guettarda platypoda

PÔRTO, V. B. S.; SILVA, M. B. R. & COELHO, L. C. B. B.

Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas,
Departamento de Bioquímica, Cidade Universitária, Recife-PE, 50670-420,
Brasil.

Abstract A lectin was partially purified from *Guettarda platypoda* when a 10% (w/v) root bast extract was submitted to 60% (w/v) ammonium sulphate fraction followed by a chitin chromatography column. Extracts of different tissues of *G. platypoda* were made with 0.15 M sodium chloride; root bast extracts were also obtained in different buffers and pH values. The selected fraction with root bast lectin (GplaRL) was obtained in 0.01 M citrate-phosphate buffer (pH 5.5) containing 0.15 M sodium chloride. Hemagglutinating activity (HA) was identified in all *G. platypoda* evaluated tissues. The highest activity was detected with human erythrocytes; HA of GplaRL was partially inhibited by glucose and sucrose. The partial purification revealed two main bands with polyacrylamide gel electrophoresis to acidic and native proteins or denatured/reduced polypeptides. Chitin column peak containing GplaRL showed one band in native polyacrylamide gel electrophoresis. GplaRL seems to be the first lectin mentioned in the genus *Guettarda*.

Keywords: Root lectin; affinity chromatography; *Guettarda platypoda*

Introduction

Lectins are a class of proteins, which possess at least one noncatalytic domain capable of specific recognition and reversible binding to carbohydrates (Peumans and Van Dame, 1995). Evidence has been showed that plant lectins occur in different types of vegetative storage tissues of a number of species belonging to different taxonomic groups (Peumans *et al.*, 1987). In plants the majority of studies have concentrated on leguminous seed lectins (Sharon and Lis, 1990; Konozy *et al.*, 2003). Lectins can also be found in other tissues such as leaves, roots, bark and even in specific organs such as flowers, buds, petioles and stems (Lis and Sharon, 1995; Coelho and Silva, 2000).

In spite of numerous studies concerning their specificity and structure, the biological role of plant lectins remains rather hypothetical (Duverger, 1997). Root lectins might be involved in host recognition during the legume/*rhizobium* symbiosis (Hirsch, 1999). They are localized in the root-hair emergence zone, and appear to be a key factor in host specificity and infection (Diaz *et al.*, 1989; Van Eijsden *et al.*, 1995; Diaz *et al.*, 1995).

Guettarda platypoda, plant of the Rubiaceae family, is well distributed in Brazilian littoral. Root basts from *G. platypoda* have been used in folk medicine as febrifuge and commonly as antiinflammatory agent, furthermore other therapeutic properties. The aim of this work was the purification of *G. platypoda* root bast lectin (GplaRL). Additionally, it was evaluated the presence of lectin(s) in other plant tissues (GplaL).

Materials and Methods

Crude Extracts

Roots of *G. platypoda* D.C. were harvested from Catuama beach (Goiana Municipality, State of Pernambuco, Brazil). They were well washed in tap water followed by distilled water; the root bark was scraped and the root basts were withdrawn, and allowed to dry at room temperature for 2-3 days. The material was powdered in a multiprocessor and extracts (10% w/v) were obtained by gentle shaking for overnight at 4°C, in 0.01 M citrate phosphate buffer (pH 3.0-7.0) with 0.15 M NaCl, or in 0.01 M phosphate buffer (pH 6.0-7.5) containing 0.15 M NaCl, or in 0.01 M Tris-hydrochloride buffer (pH 7.5-9.0) with 0.15 M sodium chloride. The extract with the highest lectin yield was obtained in 0.01 M citrate phosphate buffer (pH 5.5) containing 0.15 M sodium chloride. The latter extract was passed through gauze and centrifuged at 9,000 x *g* for 15 min at 4°C. Roots, as a whole (roots), root basts, leaves, flowers, fruits, buds, stems, branches of stems, petioles and peduncles of the plant were also washed, dried, reduced to a powder and submitted to extraction in 0.15 M sodium chloride, at identical conditions as describe above.

Lectin purification

The selected extract of root bast was submitted to 60% ammonium sulphate fractionation (F 0-60%) by addition of solid salt. After gentle stirring for 4 h at 4°C, precipitated proteins were collected by centrifugation (10,000 x *g* for 20 min at 4°C), resuspended in 0.01 M citrate phosphate buffer (pH 5.5) and dialyzed against distilled water, followed by 0.15 M sodium chloride. The

selected fraction with GplRL was applied to a 5 mL chitin column equilibrate with 0.15 M NaCl. After elution of the unbound proteins from the column, the lectin was eluted with 1 M NaCl. HA was determined and protein concentration measured.

Hemagglutinating assays

The hemagglutinating activity (HA) was determined as describe by Paiva and Coelho (1992) using glutaraldehyde treated (Bing *et al.*, 1967) rabbit or human (A, B, AB and O types) erythrocytes. HA was defined as the lowest sample dilution which showed hemagglutination; specific HA (SHA) correspondeed to HA divided by the protein concentration. Lectin inhibition assay was made with 200mM at 6,5 mM monossaccharides solutions using rabbit erythrocytes. The result was recorded visually after 45 min at room temperature.

Protein determination

The protein concentration was determined by the method of Lowry *et al.* (1951), using bovine serum as standard.

Polyacrylamide gel electrophoresis

Polyacrylamide gel electrophoresis containing sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) 10% (w/v) was carried as described by Laemmli (1970). The proteins bands were visualized by staining the gel with Coomassie Brilliant Blue (Laemmli, 1970). PAGE was performed for native acid and basic proteins

according to the methods of Davis (1964) and Reisfeld *et al.* (1962), respectively.

Affinity Chromatography

Folloing a partial purufication, chitin column was employed to isolate GplaRL. The sample (36 mg/mL) was applied to 5 mL chitin column. The colum was washed with 0.15 M NaCl until the absorbance at 280 nm was reduced at 0,05, then a sucrose solution (0.3 M) prepared in 0.15 M NaCl was used to irrigate the gel. The retained proteins were eluted at a flow rate of 30 mL/h with 1M NaCl. Fractions of 2.0 mL were collected.

Results and discussion

Roots of *G. platypoda* have been used in popular medicine for treatment of different infirmities, as febrifuge and as anti-inflammatory agent. This plant already was investigated in phytochemical studies; some substances have been isolated and characterized (Aquino, 1988).

Hemagglutinating activities were observed in all tissue extracts and F 0-60% from *G platypoda*. The highest SHA, however, were detected in leaves and buds with rabbit erythrocytes; the best SHA of roots was detected with AB human cells (Table 1). The differences in the SHA with distinct erythrocytes suggested the presence of more than one molecular form of lectin. Complex lectin mixtures were already detected at a single location within the plant (Van Damme, 1995); also, several different tissues of one plant may contain the same lectin (McPherson *et al.*, 1987). *G. platypoda* may provide an interesting material for comparison at structural level.

The majority of studied preparations were very stable in 0.15 M NaCl, for long periods, except preparations from leaves, roots and root basts. The latter preparation was stabilized in 0.01 M citrate-phosphate buffer (pH 5.5). Leaf extract and fraction were stabilized sodium phosphate buffer pH 6.0 (not showed). To obtain the highest purification it is important to define the best condition of extraction; also, it is frequently necessary a salt fractionation. Root bast activity was evaluated under different buffers, to obtain a stable lectin.

Lectins are carbohydrate-binding proteins or glycoproteins and have frequently been employed in recent years to aid in the purification and characterization of glycoproteins. GplRL preparations were purified through ammonium sulphate fractionation and chitin chromatography. A trypsin inhibitor has been isolated from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography in immobilized *Cratylia mollis* isolectins (Paiva *et al.*, 2003).

The presence of lectins in extracts and F 0-60% from root bast in selected buffer was assessed by erythrocyte agglutination. The highest SHA was obtained with A and O human cells (Table 2). The fraction was inhibited in the presence of glucose and sucrose. More than ten carbohydrates were assayed.

To evaluate GplRL purity prepared by ammonium sulphate fractionation and chitin affinity chromatography, SDS-PAGE and PAGE to acidic proteins were performed (Figures 1 and 3) with fractions containing GplRL. The gels revealed two main bands, under distinct running times or pH conditions, in both gels. SDS has been found to be an effective irreversible inactivator of proteins. This detergent is known to bind proteins strongly, besides SDS brings about protein dissociation into subunits.

GplaRL did bind to a chitin column. This preliminary experiment indicates that the matrix could be very useful to obtain the lectin. It is important to mention that the unbound stained fractions did not show lectin activity. Sucrose was not able to displace the lectin. The elution was performed non-biospecifically with 1 M NaCl (Figure 2). Increasing the ionic strength of the irrigating buffers leads to at least a partial loss of the advantages of using a biospecific adsorbent. However, the lectin obtained without carbohydrates could be of value for a structural approach where carbohydrate recognition is involved.

The chitin column peak containing GplaRL migrated at the front run as one band in PAGE to acidic proteins (Figure 3).

GplaRL preparations (extracts, F 0-60% and chitin column) will be useful to unravel the structure of the interesting lectin, as well as to speculate the pharmacological effects of the samples. Besides the availability of a new lectin preparation, GplaRL, this paper revealed, to our knowledge, the first lectin mentioned in the genus *Guettarda*.

References

- Aquino, R., Simone, F., Pizza, C., Cerri, R. & Mello, J. F. (1998). Quinovic acid glycosides from *Guettarda platypoda*. *Phytochemistry* 27, 9, 2927-2930.
- Bing, D. H., Weyand, J. G. M. & Stavitsky, A. B. (1967). Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 124, 1166-1170.
- Coelho, L. C. B. B. & Silva, M. B. R. (2000). Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis* 11, 1-6.
- Davis, B. J. (1964). Disc electrophoresis II: method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.
- Diaz, C. L., Logman, T. J. J., Stam, H. C. & Kijne, J. W. (1995). Sugar-binding activity of pea lectin expressed in white clover hairy roots. *Plant Physiology* 109, 1167-1177.
- Diaz, C. L., Melchers, L. S., Hooykaas, P. J. J., Lugtenberg, B. J. J. & Kijne, J. W. (1989) Root lectin as a determinant of host plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature* 338, 579-581.
- Duverger, E. & Delmotte, F. M. (1997). Purification of lectus from *Robinia pseudoacacia* L. root-tips. *Plant Science* 23, 9-18.
- Hirsch, A. M. (1999). Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology* 2, 320-326.

- Konozy, E. H. E., Bernardes, E. S., Rosa, C., Faca, V., Greene, L. J. & Ward, R. J. (2003). Isolation, purification and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 40, 222-229.
- Laemili, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chemistry* 193, 265-275.
- MacPherson, A., Hankins, C. N. & Shannon, L. (1987). Preliminary x-ray diffraction analysis of crystalline lectins from the seeds and leaves of *Shophora japonica*. *Journal Biochemistry* 262, 1791-1794.
- Paiva, P. M. G. & Coelho, L. C. B. B. (1992). Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart (camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 36, 113-118.
- Paiva, P. M. G., Souza, A. F., Oliva, M. L. V., Kennedy, J. F., Cavalcanti, M. S. M., Coelho, L. C. B. B. & Sampaio, C. A. M. (2003). Isolation of a trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. *Bioresource Technology* 88, 75-79.
- Peumans, W. J., Allen, A. K., Nsimba-Lubaki, M & Chrispeels, M. J. (1987). Related glycoprotein lectins from root stocks of wild cucumbers. *Phytochemistry* 26, 4, 909-912.
- Peumans, W. J., & Van Damme, E. J. M. (1990). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology* 109, 347-352.

- Reisfeld, R. A., Lewis, V. J. & Williams, D. E. (1962). Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature* 195, 281-283.
- Sharon, N & Lis, H. (1990). Legume lectins - a large family of homologous proteins. *FASEP Journal* 4, 3198-3208.
- Sharon, N. & Lis, H.(2001) The structural bases for carbohydrate recognition by lectins. In: Wu, A. M. *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2*. Taiwan: Kluwer Academic Plenum Publishers, 1-9.
- Van Eijsden, R. R., Diaz, C. L., De Pater, R. & Kijne, J. W. (1995). Sugar-binding activity of pea (*Pisium sativum*) lectin is essential for heterologous infection of transgenic white clover hairy roots by *Rhizobium leguminosarum* bv. *Vicia*. *Plant Moleculla and Biology* 29, 431-439.

Table 1. Protein concentrations and specific hemagglutinating activity of F 0-60% from different tissues of *Guettarda platypoda* in 0,15 M NaCl.

Tissue	Protein concentration (mg/mL)	Erythrocytes				
		Rabbit	Human			
			A	B	AB	O
Root	0.3	123.1	123.1	246.2	492.3	246.2
Root bast	8.5	0	3.8	7.6	15.1	7.6
Leaf	12.1	679.3	10.6	42.5	21.2	21.2
Flower	21.3	385.3	12.0	24.1	24.1	24.1
Petiole	13.5	76.1	9.5	76.1	18.3	76.1
Peduncle	22.6	90.7	5.7	22.7	5.7	11.3
Fruit	27.9	18.3	18.3	146.7	36.7	73.4
Buds	1.1	1,932.1	60.4	966.0	483.0	483.0
Stems	0.6	54.2	54.2	54.2	217.0	54.2
Branches stens	8.3	123.1	15.4	123.1	123.1	61.5

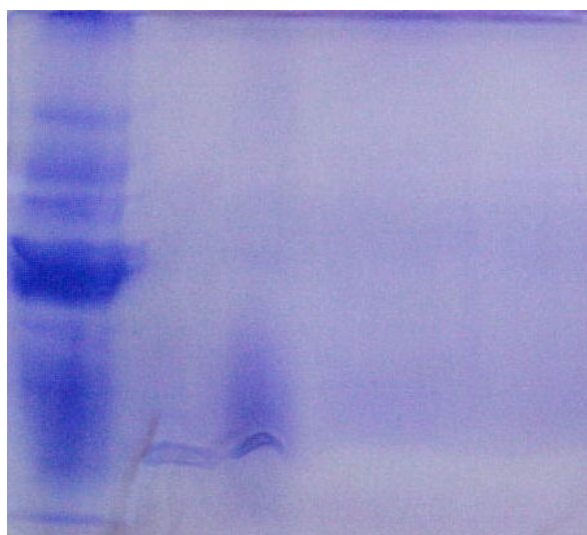
Table 2. Specific hemagglutinating activity of preparation of root bast from *Guettarda platypoda* in citrate-phosphate buffer pH 5.5.

Erythrocytes	Crude extract ^a	F 0-60% ^b
Human ^c		
A	11.1	54.3
B	0.3	6.8
AB	1.4	6.8
O	10.9	27.2
Animal ^d		
Rabbit	0.3	6.8

^a Protein concentration 23.4 mg/mL

^b Protein concentration 18,9 mg/mL

^{c, d} Glutaraldehyde-treated erythrocytes



A B C D

Figure 1. SDS-PAGE 10% with samples from *G. platypoda*. (B) Root bast extract 10%, (C) F 0-60% in citrate phosphate buffer(pH 5,5), (D) Supernatant of F 0-60% of root bast from *G. platypoda*. (A) standards: bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (29kDa), trypsinogen (24kDa), trypsin inhibitor (20kDa), and α -lactalbumin (14kDa). Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue.

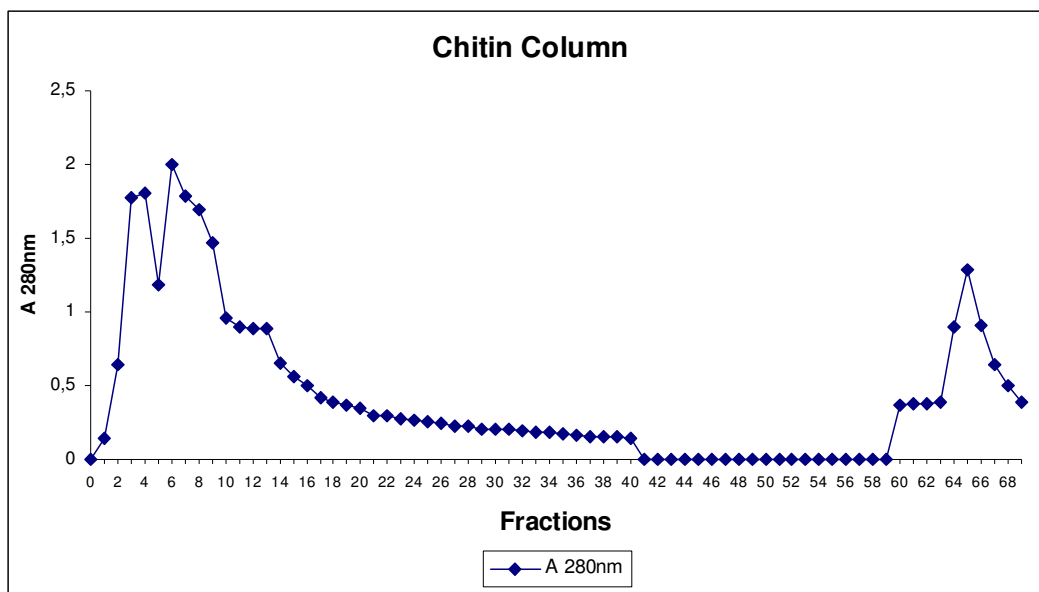


Figure 2. Affinity chromatography on chitin column. Sample of F 0-60% (36 mg of protein) was applied to a column (5 mL) equilibrated with 0.15 M NaCl. The retained proteins were eluted at a flow rate of 30 mL/h with 1 M NaCl. Fractions of 2.0 mL were collected.

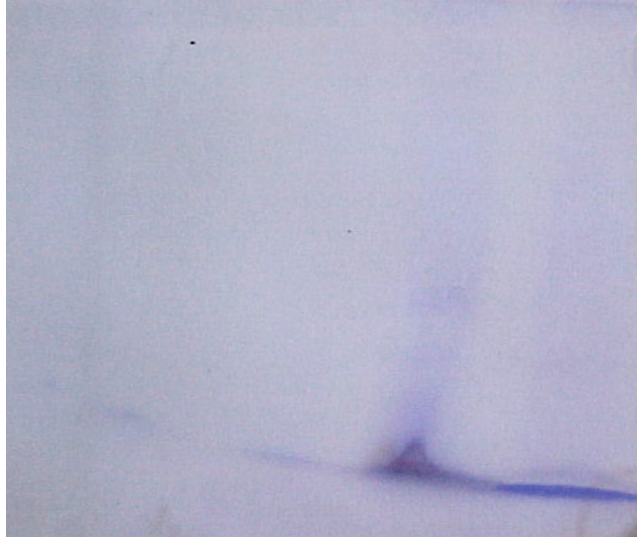


Figure 3. Native polyacrylamide gel electrophoresis. (A) Peak of chitin column (GplaRL), (B) non adsorbed, (C) F 0-60% and (D) extract of root bast *G. platypoda*. Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue.

CONCLUSÃO

O presente trabalho permite concluir que raízes de *Guettarda platypoda* D. C. contém uma lectina que pode ser parcialmente purificada através da precipitação salina seguida de cromatografia em quitina.

ANEXO

Resumo submetido a SBBq
XXXII Reunião Anual
Caxambu, 2003

PARTIAL PURIFICATION OF A ROOT LECTIN FROM

Guettarda platypoda

Santos, V. B. P.; Silva, M. B. R. and Coelho, L. C. B. B

Departamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco,
Recife, PE. E-mail: valbsporto@ig.com.br

Lectins are proteins or glycoproteins that bind carbohydrates with distinct degrees of selectivity. They are normally found in a variety of organisms being involved in numerous cellular processes. In this work a root lectin was partially purified from *Guettarda platypoda* D.C. (angélica). Roots of this plant have been used in popular medicine for treatment of different infirmities. Extracts (10% w/v) in 0.15 M NaCl of roots, leaves, flowers, fruits, peduncles, petioles, stems, branches of stem and buds were obtained; root extracts were performed with different buffers and pH values (citrate-phosphate pH 3.0–7.0; TRIS–HCl pH 7.5–9.0; sodium–phosphate pH 6.0–7.5). All extracts were submitted to ammonium sulphate fractionation (F0-60%) by addition of solid salt. Hemagglutinating activity (HA) was identified in all *G. platypoda* evaluated tissues; the highest activities were detected with buds and leaves. The selected fraction with root lectin (GplaRL) was obtained in 0.01 M citrate-phosphate buffer (pH 5.5) containing 0.15 M sodium chloride. HA was partially inhibited by glucose and sucrose. The partial purification revealed two main bands with polyacrylamide gel electrophoresis to acidic and native proteins or denatured/reduced polypeptides. GplaRL seems to be the first lectin mentioned in the genus *Guettarda*.

Supported by CNPq.