

Obtenção de lectinas vegetais através do método de cromatografia de afinidade com membrana semipermeável de glicose

Herico Santos da Silva¹ (IC), Iara de Fátima Gimenez² (PQ), Sidney José Lima Ribeiro³ (PQ), Marcelo Leite dos Santos^{1*} (PQ) *mleitesantos@hotmail.com

¹Departamento de Química (DQCI), Universidade Federal de Sergipe, Campus Prof Alberto Carvalho, Itabaiana-SE.

²Departamento de Química (DQI), Universidade Federal de Sergipe, Campus Prof Aloísio Campos, São Cristóvão-SE.

³Instituto de Química (IQ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara-SP.

Palavras Chave: Lectinas, Purificação e Membrana de Glicose.

Introdução

Lectinas são importantes proteínas que se ligam especificamente a diferentes açúcares [1]. A Concanavalina A (ConA) é uma lectina extraída de *Canavalia ensiformis*, popularmente conhecido como feijão-de-porco [2] e amplamente estudada como sistema modelo no entendimento da base molecular do reconhecimento protéico por carboidratos [3]. Esta lectina pode ser obtida através de diferentes técnicas de purificação, por exemplo, a partir da aplicação de sistema aquoso bifásico de PEG 8000/Citrato [4]. No presente trabalho, realizamos um estudo inédito de purificação da ConA através da cromatografia de afinidade empregando uma membrana semipermeável de glicose, fornecida por colaboradores.

Resultados e Discussão

Para a extração da ConA, uma mistura de 20% (m/v) do pó das sementes de *Canavalia ensiformes* com água foi mantida sob agitação a 4°C *overnight*. A solução foi filtrada e centrifugada a 3000 rpm por 5 min. Adicionamos em um funil de separação a membrana semipermeável de glicose e o extrato bruto. O sistema ficou em repouso por 30 min para a ligação da ConA na resina. Recolhamos o extrato bruto (*Flown Through*) e adicionamos 50 mL de água para retirar o excesso de extrato que ficou sobre o gel (lavado). A eluição da ConA foi realizada com a aplicação de sucessivas soluções de glicose de concentração crescente: 0,2M, 0,4M, 0,6M, 0,8M e 1,0M de glicose. Todas as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE 15%) seguindo protocolos pré-definidos [5], figura 1.

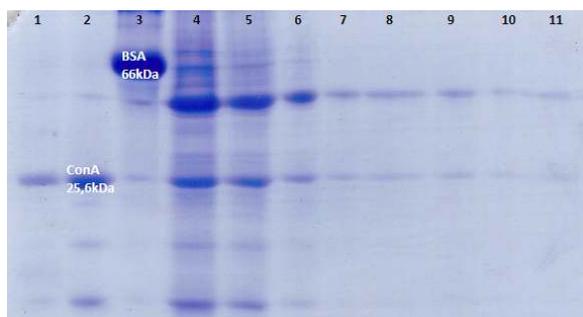


Figura 1: Gel de poliácridamida (SDS-PAGE 15%): 1) padrão em kDa, 2) ConA comercial, 3) BSA, 4) extrato bruto, 5) *Flown Through*, 6) Lavado, 7-11) Frações eluídas.

Pode-se observar no poço 1 que o marcador não aparece com todas as bandas, fato decorrente da baixa qualidade do mesmo. No poço 2 e no 3 podem-se observar, respectivamente, as bandas correspondentes a ConA e a BSA (albumina de soro bovino) comerciais, estas proteínas serviram como guia para acompanhar o procedimento de purificação da Concanavalina A do feijão-de-porco. No poço 4 temos o extrato bruto, pode-se notar a presença de ConA, comprovando que a extração com água ultrapura foi bem sucedida. Além da ConA, também pode-se observar uma banda abaixo de 66kDa de uma proteína contaminante presente em grande quantidade. No poço 5 é observado o *Flown Through* mostrando que parte da ConA não se ligou a membrana de glicose. No poço 6 vemos que a lavagem com água foi capaz de remover parte das proteínas, provavelmente aquelas presentes na superfície da membrana. Do poço 7 ao 11 pode-se observar que o gradiente de glicose aplicado elui a ConA, mas que parte da proteína contaminante de maior massa molecular continua presente. Assim, etapas sucessivas de purificação com a membrana de glicose e/ou aplicação de outras técnicas de purificação em conjunto serão necessárias para a completa separação da ConA, o que já está em desenvolvimento em nosso grupo.

Conclusões

Pelo observado, percebemos que a aplicação da membrana semipermeável de glicose como matriz de ligação da Concanavalina A permitiu a separação desta proteína da maior parte dos contaminantes. A aplicação dessa membrana aparece como alternativa promissora como método de separação de lectinas, já que muitas destas proteínas apresentam especificidade por glicose.

Agradecimentos

PIBIC/FAPITEC/CNPq

[1] Van Damme, E.J.M.; *et al. Glycoconjugate Journal*. **2003**, 20, 449-460.

[2] Sumner, J.B.; Gralen, N.; Eriksson-Quensel, I.B. *Science*. **1938**, 87, 395-396.

[3] Correia, M.T.S.; Coelho, L.C.B.B.; Paiva, P.M.G. In: *Recent Trends in Toxicology, Transworld Research Network*, **2008**.

[4] Soares, P.A.G.; *et al. Journal of Chromatography B*. **2011**, 879, 457-460.

[5] Schägger, H.; von Jagow, G. *Anal Biochem*. **1987**, 166, 368-379.