

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LECTINAS PRESENTES EM EXTRATOS DE FOLHAS DE *Bauhinia variegata L.*

CERRUTI, Giovanni Victório¹; PINTO, Luciano da Silva^{1,2}

¹ Laboratório de Bioinformática e Proteômica - CDTec/UFPel. ² Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia UFPel. Caixa Postal - 354 CEP - 96010-900, Pelotas, RS.

E-mail: gvicerruti@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A definição mais aceita sobre lectinas se dá por proteínas ligantes de carboidratos, de origem não-imune, aglutinante de células e glicoconjugados, com capacidade de reconhecimentos específicos e de manter ligações reversíveis com carboidratos e substâncias contendo açucares, sem alterar a estrutura covalente de alguns ligantes glicosílicos (GOLDSTEIN *et al.*, 1980). São proteínas distribuídas ubliquamente na natureza, especialmente em vegetais.

No caso, a lectina da planta *B. variegata L.* é classificada como uma hololectina, pelo fato de possuir múltiplos sítios de ligação e capacidade aglutinante.

O gênero *Bauhinia* L. (família Fabaceae – subfamília Caesalpinoideae) é de ocorrência pantropical, compreendendo cerca de 235 à 300 espécies. Estas plantas são amplamente utilizadas na medicina tradicional com diversas indicações, como diurético, analgésico e no tratamento de diabetes (SALATINO *et al.*, 1999; SILVA; CHECHINAL FILHO, 2002). Pesquisas utilizando o extrato desta planta confirmaram as atividades antiinflamatória, antibacteriana (POKHREL *et al.*, 2002), antiviral (MARCHETTI *et al.*, 1995; TAYLOR *et al.*, 1996) e antitumoral. Lectinas de *B. variegata L.* proveniente de sementes já foram previamente isoladas e caracterizadas (PINTO *et al.*, 2008), nesse orgão vegetal de reserva a quantidade de lectinas presentes é maior quando comparado às folhas.

Em virtude dos promissores resultados apontados por estudos utilizando lectinas e da escassa literatura existente sobre lectinas provenientes de folhas, o objetivo desse estudo é verificar a presença de lectinas presentes em extratos de folhas

de *Bauhinia variegata L.*, realizar sua purificação por cromatografia de afinidade e caracterização molecular.

2. METODOLOGIA

As folhas de *B. variegata* utilizadas foram coletadas no município de Capão do Leão, RS. O processo de obtenção dos extratos consistiu na Trituração de 8 gramas de folha maceradas em nitrogênio líquido em conjunto com o tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 com NaCl 150 mM. Os extratos permaneceram sob agitação a 4 °C por 24 horas e posteriormente, centrifugados por 15 minutos a 10.000 g em temperatura de 4 °C e filtrados. O extrato bruto foi precipitado com sulfato de amônio 0-60% por 24 horas na geladeira e centrifugadas novamente sob as mesmas condições. O pellet foi ressuspendido utilizando 3 ml de solução tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 com NaCl e posteriormente submetido à diálise contra H₂O destilada com cinco trocas com intervalo de 2 em 2 horas, sendo que a última troca foi contra o tampão utilizado na extração.

A amostra dialisada foi purificada por meio da técnica de cromatografia de afinidade, no caso utilizando a coluna agarose-lactose (Sigma) e eluídas com 30 mL de tampão glicina 50mM pH 2,6 com NaCl 150 mM. A amostra purificada foi então dialisada e liofilizada. A lectina resultante da liofilização foi ressuspensa em 1mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 com NaCl 150 mM e utilizada no ensaio de eletroforese SDS-PAGE. O gel de poliacrilamida 15% foi submetido a eletroforese durante duas horas juntamente com o marcador molecular BenchMark Protein Ladder. O gel foi corado em *Comassie Blue* e posteriormente descorado e fotografado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato protéico obtido de folhas de *B. variegata* foi aplicado em uma coluna cromatográfica de afinidade contendo a matriz Agarose-Lactose. Na figura 1 é possível observar a eluição da lectina BvLf após a aplicação do tampão de eluição Glicina 50 mM com NaCl 150 mM. A lectina de folhas de *B. variegata* reconhece o carbohidrato Lactose imobilizado na matriz de Agarose conforme o já observado para lectinas de sementes de *Bauhinia*.

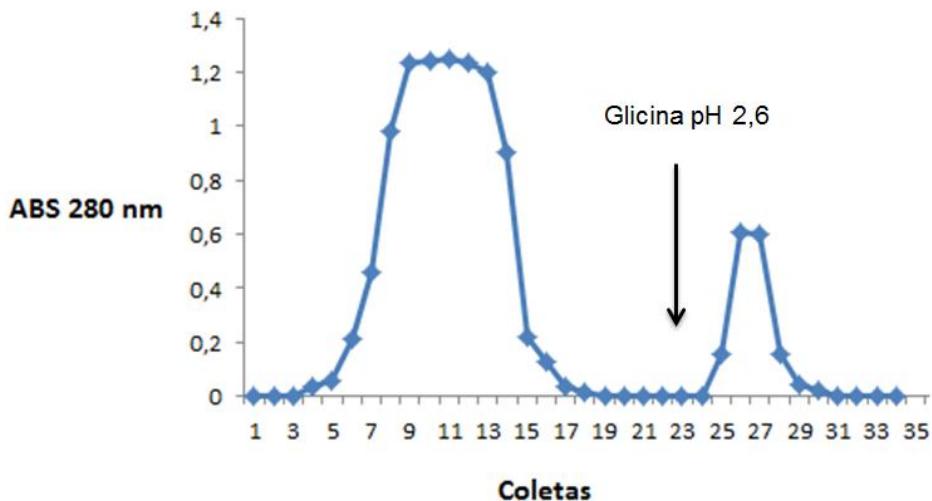


Figura 1- Purificação da lectina de folhas *B. variegata* por cromatografia de afinidade em coluna de Agarose-Lactose. A coluna foi equilibrada e lavada com Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo NaCl 150 mM antes da remoção da proteína ligada. A lectina foi eluída com tampão Glicina pH 2,6 contendo NaCl 150 mM.

Na figura 2 observa-se a presença da lectina BvLf com massa molecular aparente semelhante a lectina de BVL purificada de sementes de *B.variegata*. Esta lectina tem sido implicada em diferentes ações biológicas tais como inibição da adesão inicial de bactérias orais (Klafkle et al, 2013), cicatrização epitelial e proliferação celular (Reis et al., 2008). Assim é possível que a lectina BvLf possa atuar da mesma forma, mas para isso ainda ensaios de caracterização da atividade biológica precisam ser realizados.

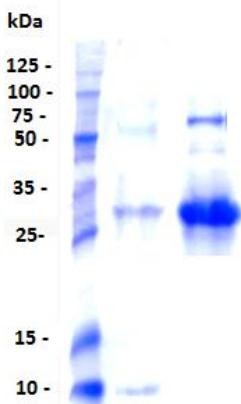


Figura 2: Eletroforese da expressão da lectina BVL extraída de folhas de *Bauhinia variegata* em gel de poliacrilamida 15%. (1): Marcador de massa

molecular: BenchMark Protein Ladder. (2): BvLf purificada conforme indicado na figura 1. (3) Lectina BvL extraída de sementes de *B. variegata*.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados conclui-se que folhas de *B. variegata* possuem uma lectina com massa molecular semelhante a lectina de sementes desta planta e sua caracterização em relação a sequência e atividade biológicas precisam ser melhor caracterizadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SHARON, N.; LIS, H.; **Lectins**, Springer, Netherlands, 2007, 2v.

DUARTE, M.; SILVA, A. G.; *Bauhinia variegata*: Diagnose Morfoanatômica e Análise Comparativa entre Exemplares de Regiões Climáticas Distintas. **Latin American Journal of Pharmacy**, Curitiba, v. 26, nº. 6, p 837-45, 2007.

COELHO, L. C.; SILVA, M. B.; Simple Method to Purify Milligram Quantities of the Galactose-Specific Lectin from the Leaves of *Bauhinia monandra* **Phytochemical Analysis**, Pernambuco, v. 11, p 295-300, 2000.

SILVA, M. C.; CORREA, A. D.; Extraction of the lectin of cassava leaves(*Manihot esculenta* Crantz) and the effect of divalent cations on the hemagglutinating activity, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p 103-107, 2010

DUARTE, M.; DEBUR, M. C.; Caracteres morfo-anatomicos de folha e caule de *Bauhinia microstachya* (Raddi) J. F. Macbr. (Fabaceae), **Revista Brasileira de Farmagnosia**, v. 13, nº 1, p 7-15, 2003.

POVINELI, K.L.; FINARDI, F.; The multiple functions of plant lectins. Nutrire; **Revista Soc. Bras. Alim. Nutr.**, São Paulo, v 24, p 135-156, 2002.

G. B. KLAFKE, S. BORSUK, R. A. GONÇALES , Inhibition of initial adhesion of oral bacteria through a lectin from *Bauhinia variegata* L. var. variegata expressed

in *Escherichia coli*, **Journal of Applied Microbiology**, vol. 115, no. 5, pp. 1222–1230, 2013.

REIS , E. A.G.; ATHANAZIO, D. A.; CAVADA, B.S.; TEIXEIRA, E.H.; PINTO, V.P.T.; CARMO, T.M.A.; REIS, A.; TROCOLLI, G.; CRODA, J.; HARN, D.; BARRAL-NETTO, M.; REIS, M. G. Potential immunomodulatory effects of plant lectins in *Schistosoma mansoni* Infection. **Acta Tropica**, v. 108, p. 160–165, 2008.