

AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE FOLHAS *Bauhinia variegata* L. QUANTO A PRESENÇA DE LECTINAS

STOLL, Stefani Natali¹; SILVEIRA, Carolina da Silva¹; SILVEIRA, Carla Ferreira^{1,2}; PINTO, Luciano da Silva^{1,2}

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

E-mail: stoll.cenbiot@ufpel.edu.br

1 INTRODUÇÃO

Capazes de interagir de maneira específica e reversivamente com glicídeos, as lectinas são definidas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que, além de propriedade de se ligar a açúcares, podem aglutinar células animais sem alterar a estrutura química dos ligantes (GOLDSTEIN et al., 1980; LIENER et al., 1986). Essas proteínas são encontradas em todas as classes de seres vivos bem como também em vírus (SHARON & LIS, 1989).

O gênero *Bauhinia* é pertencente à família botânica *Fabaceae* e algumas espécies têm sido empregadas, por meio de chás, no tratamento de diabetes, sendo também utilizadas como eficiente diurético. Lectinas provenientes de sementes de *B. variegata* L. (Pata-de-vaca) foram previamente isoladas e caracterizadas (PINTO et al., 2008).

Não obstante, em se tratando de lectinas vegetais, a maior parte das lectinas conhecidas é extraída de sementes de Leguminosas, sendo a extração das provenientes de folhas ainda pouco explorada (OLIVEIRA, 2006). Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi a extração de lectinas presentes em folhas de *Bauhinia variegata* L., sua purificação por cromatografia de afinidade e caracterização, a fim de comparar com a lectina obtida de sementes desta planta.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As folhas da *B. variegata* foram coletadas no município de Capão do Leão-RS. Os extratos realizados em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 com NaCl 150 mM sob agitação a 4°C, a partir de 3 gramas de folhas maceradas com nitrogênio líquido. Os extratos foram centrifugados por 15 minutos, a 10149 g, a 4°C e filtrados para a obtenção do extrato bruto. As proteínas do extrato foram precipitadas com sulfato de amônio 0-60% por 3 horas à temperatura ambiente e centrifugadas novamente. O precipitado foi dialisado em água destilada com, no mínimo, cinco trocas de intervalo de duas horas cada, a diálise final foi realizada no mesmo tampão de extração.

A amostra centrifugada foi submetida a teste de atividade hemaglutinante (HA) com sangue de coelho e então cromatografada em coluna Sephadex G-25. As alíquotas coletadas foram submetidas a testes de HA, sendo as com atividade, aplicadas na coluna de afinidade agarose-lactose (Sigma) e eluída em 20 mL de tampão glicina 50 mM pH 2,6 com NaCl 150 mM. Fez-se teste de HA também com o produto da eluição. Amostra, então, foi dialisada em água destilada e liofilizada. A lectina liofilizada foi ressuspensa em 1ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,6 com NaCl 150 mM e utilizada para ensaio de hemaglutinação e eletroforese (SDS-PAGE). O gel de poliacrilamida (12%) foi corrido por 2 horas com o marcador *BenchMark Protein*

Ladder (Invitrogen). O gel foi corado com *Coomassie Blue* ou azul de *Coomassie*, posteriormente descorado e fotografado.

A amostra de proteína purificada foi avaliada por *Western-blotting*. Nesta etapa, após a transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose, esta foi bloqueada com leite em pó (5%) por 1 hora. Após o período, a membrana foi lavada com PBS-T e incubada com anticorpo policlonal Anti-BVL produzido em coelho. A membrana foi lavada com PBS-T e incubada com anticorpo monoclonal Anti-anticorpo de coelho conjugado com peroxidase. A revelação foi realizada com *Diaminobenzidina (DAB)*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos de folhas de *B. variegata* quando submetidos a teste de atividade hemaglutinante- utilizando sangue de coelho- apresentaram atividade, semelhante ao que acontece com a lectina BVL extraída de sementes (PINTO et al, 2008), após 10 minutos em estufa a 37°C. O extrato protéico manteve sua atividade hemaglutinante após cromatografia em coluna de Sephadex-G25. Essa estratégia foi necessária para a retirada de pigmentos provenientes do extrato bruto. As frações eluídas dessa coluna foram submetidas à cromatografia de afinidade sendo que o produto da eluição demonstrou também boa atividade hemaglutinante. As amostras foram dialisadas, congeladas e liofilizadas para posterior caracterização.

A migração em gel de Poliacrilamida mostrou sinais (bandas) expressivas e passíveis de comparações com a BVL semente. A lectina proveniente de folhas de *B. variegata* apresentou massa molecular de aproximadamente 50 kDa (Fig. 1), diferente do padrão obtido para lectina de sementes: aproximadamente 30 kDa.

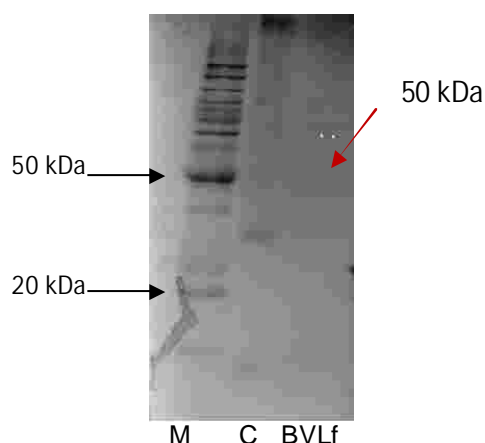


Figura 1: Gel de poliacrilamida (12%) correspondente à migração eletroforética do extrato de folhas de *B. variegata* L. M: Marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen); C: Controle BVL semente; BVLf: lectina de folhas de *B. variegata*.

Por outro lado, quando observado os resultados no *Western-blotting* da lectina BVLf (Fig. 2), foi possível verificar a presença tanto da proteína de 50 kDa quanto da de 30 kDa. Em estudo precedente, Oliveira (2006), obteve uma lectina de 14 kDa purificando extratos de folhas de *B. variegata* em coluna de Quitina. Esta matriz cromatográfica apresenta o polissacarídeo N-acetilglicosamina, diferente do glicídeo presente na matriz de agarose-lactose empregada para a purificação da lectina BVLf neste experimento. Esses resultados sugerem a existência de mais de

uma lectina nas folhas dessa espécie. Fato este plenamente possível já que Pinto e colaboradores (2008) identificaram duas isoformas da lectina de *B. variegata* em sementes.

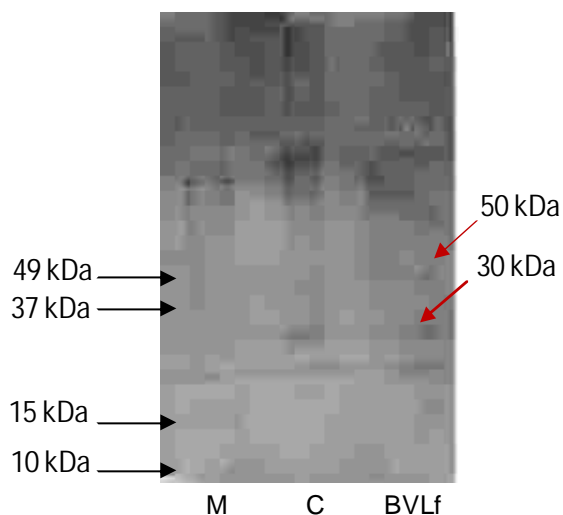


Figura 2: Western-blotting das lectinas de semente e folhas de *B. variegata* L. M: marcador *BenchMark Pre-Stained Protein Ladder* (Invitrogen); C: controle BVL purificada de sementes e BVLf: *B. variegata* purificada de folhas.

Os anticorpos produzidos contra a proteína nativa de sementes foram capazes de reconhecer as proteínas extraídas da folha, sugerindo similaridade entre essas proteínas.

4 CONCLUSÃO

Através de trabalho realizado, foi possível isolar e purificar a lectina proveniente de folhas de *B. variegata* através de cromatografia em coluna de afinidade. Tal lectina apresentou atividade hemaglutinante em eritrócitos de coelho, apresentando um perfil eletroforético semelhante a lectina de folha, mas com destaque para uma banda de aproximadamente 50 kDa- diferente daquela encontrada na lectina de semente.

5 REFERÊNCIAS

LIMA, Hélio Cabral. **Purificação e Caracterização Parcial de uma Lectina de Semente de *Canavalia aff. Boliviana* e Clonagem de seu Gene.** 2000. Tese/Dissertação (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

MOREIRA, Renato de Azevedo Plant **Lectins Chemical and Biological Aspects** Mem. Intit. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 86. Suppl II, 211-218, 1991.

OLIVEIRA, Manuel Messias. Extração, Isolamento e caracterização físico-química parcial de lectina de *Bauhinia variegata* var. cândida. **WORKSHOP MEIO**

AMBIENTE, CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE MÃOS DADAS PARA O FUTURO.
Recife-PE, 2006. Anais 1 WORKSHOP.

PINTO, Luciano, Nagano, S; Oliveira, M; Moura, R; Sampaio, H; Debray H; Pint, P; Dellagostin, A e Cavada, S, Purification and Molecular Cloning of a New Galactose-Specific Lectin From *Bauhinia variegata* Seeds; **J. Biosci.** v. 33 355–363, 2008.