

APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DA LECTINA DA VAGEM DE *Libidibia (Caesalpinia) ferreavar.parviflora*

Maria Eduarda Torres de Carvalho¹; Maria Tereza dos Santos Correia²

¹Estudante do Curso de Biomedicina - CCB – UFPE; E-mail: Eduarda_carvalho1@hotmail.com,

²Docente/pesquisador do Depto de Bioquímica – CCB – UFPE. E-mail:

Sumário: As lectinas são macromoléculas de origem não imunológicas pertencentes ao grupo das proteínas, que possuem diversas funções biológicas. Este projeto teve como objetivo avaliar a afinidade da lectina de *L. ferrea* por substâncias húmicas, determinação de sua atividade coagulante, atividade antioxidante e atividade hemolítica dentro do grupo sanguíneo ABO. A lectina apontou uma diminuição de AH frente ao ácido húmico; no teste de coagulação do caolin apresentou resultado positivo em comparação com o controle utilizado, o sulfato de alumínio, e no teste de difusão radial foi observado que todas as amostras lectínicas (extrato, F80 e LifeFPL) apresentaram linhas de precipitação com o ácido húmico, indicando a forte ligação da lectina com este ácido. De uma maneira geral LifeFPL não se apresentou atividade hemolítica para os eritrócitos do sistema ABO, nas concentrações testadas. Em conclusão, LifeFPL demonstrou ser um composto coagulante, o qual não parece apresentar danos a população que o composto geralmente utilizado, o sulfato de alumínio.

Palavras-chave: Lectinas; LifeFPL; Proteína.

INTRODUÇÃO

As proteínas são macromoléculas extremamente versáteis, as quais possuem funções primordiais no organismo, que vão desde o metabolismo celular ao transporte de substâncias essenciais a homeostase corporal. Dentre as proteínas caracterizadas há um grupo nominado de lectinas (originado do latim, “Lectus”, que significa escolhido, selecionado), a qual se refere à aglutinação de eritrócitos e à ligação seletiva e reversível que essas proteínas possuem aos carboidratos. As lectinas não são produtos de uma resposta imune, ou seja, possuem uma origem não imunológica. O destaque é dado pois há anticorpos anticarboidratos que possuem a função de aglutinar células. Essas proteínas são encontradas em plantas, onde foram inicialmente descobertas e relatadas, mas também são isoladas em microrganismos, animais vertebrados e invertebrados. As plantas dispõem de reservas abundantes de lectinas, tendo sua distribuição ao longo de todo seu comprimento. (SÁ et al, 2008). A *Libidibia ferrea* (LifePFL) é uma planta a qual pertence à família Fabaceae Caesalpinioideae (Caesalpinaceae) (LORENZI, 2008), com ampla distribuição em todo o território brasileiro. São popularmente chamadas de Pau ferro ou jucá e possuem suas diferentes partes utilizadas no tratamento de várias doenças e sintomas. As lectinas de plantas são facilmente isoladas por cromatografia de afinidade, devido a sua especificidade para glicoproteínas (COELHO et al., 2015). O esquema apresentado na figura 2 ilustra o método, onde dentre várias substâncias presentes na fração proteica, apenas a lectina deve-se ligar à matriz. As moléculas que não possuem nenhuma ou baixa afinidade com a matriz – suporte passa pela coluna sem serem retidas. Após a ligação a matriz, as lectinas são eluídas por uma mistura que altera o pH e/ou a força iônica do meio, levando a instabilidade da lectina e dissociação matriz suporte (COLLINS, et al 2006). As plantas

constituem uma excelente fonte de substâncias para novos fármacos, mas para que um novo fármaco venha ser usado, o mesmo não pode ser tóxico; se faz necessário, então, testes de toxicidade como a avaliação de citotoxicidade às células sanguíneas (leucócitos e eritrócitos). Neste contexto, tem-se o ensaio hemolítico, que pode ser realizado da seguinte forma: eritrócitos são incubados com as biomoléculas por 2 h e agitação branda, a 38°C em 1atm; após o tempo decorrido o sobrenadante é mesurado por absorvância a 545 nm.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Purificação da lectina:

A lectina foi purificada por protocolo previamente estabelecido no Laboratório de Glicoproteínas da UFPE. A lectina foi obtida a partir de extrato a 10% (p/v) em NaCl 0,15 M, utilizando a farinha. O extrato bruto assim preparado foi submetido a um fracionamento salino 0-80% (p/v), no qual, sulfato de amônio sólido foi adicionado ao extrato e posto à agitação por 4 h em temperatura ambiente (27°C). Após centrifugação o precipitado obtido foi suspenso com NaCl 0,15 M denominando-o de Fração 80% (F80). A F80 (10 mg) foi submetida à cromatografia por afinidade em coluna contendo 10 mL de quitina equilibrada com NaCl 0,15 M; em seguida foi utilizado ácido acético 1M como eluente da lectina

2. Atividade coagulante com caolin:

O método foi efetuado de acordo com GHEBREMICHAEL et al. (2005) e realizados em triplicata. Em uma cubeta de 3mL, alíquotas (200 µL) de: EB, F80 ou LifeFPL (1 mg/mL) ou um controle positivo (Sulfato de Alumínio a 5%), foram adicionadas a 1800 µL de uma solução de caolin a 10 mg/L, homogeneizadas e imediatamente incubadas em temperatura ambiente (27 °C) por 1 h. Um volume de amostra de 1 mL do alto da cubeta foi transferido para uma cubeta de 1 mL para medida da absorvância a 500 nm, a cada 5 min por 1 h. Posteriormente, a leituras foram realizadas a cada 10 min por mais 1 h e 20 min. A redução da absorvância define a atividade coagulante.

3. Difusão Radial:

A difusão radial foi realizada em placas de Petri contendo gel de agarose preparado em NaCl 0,15 M a uma concentração de 1% (p/v). Uma solução de ácido húmico (30 µL) com uma concentração de 100 e 200 mg/mL foi colocada em um poço central enquanto que os poços periféricos foram ocupados com 30 µL das amostras protéicas (extrato, F0-80 e CfePL) a 1 mg/mL. O ensaio foi executado em câmara húmida a 4°C por 48 h. Os géis foram lavados exaustivamente com NaCl 0,15 M para a retirada de compostos não ligados e corados por 2 h com Azul Brilhante de Coomassie 0,1% (p/v).

4. Atividade hemolítica:

Inicialmente, uma suspensão, de eritrócitos de humano, dentro do sistema ABO, a 2% (v/v) foi preparada seguida de descarte do plasma. O sangue foi lavado 4 vezes com solução isotônica de cloreto de sódio (1500 rpm/ 15min). Os eritrócitos lavados foram suspensos em solução fisiológica salina numa concentração final de 2% (v/v). O grau de hemólise das amostras foi efetuado em ensaios colorimétricos, de acordo com o método de De-Qiang (2011). As amostras lectínicas (0,3 mL) em concentrações que variaram de 50 a 200 µg/mL foram adicionadas a tubos de ensaios contendo NaCl 0,15 M (2,2 mL). Em seguida, foram adicionados a esses tubos 2,5 mL da suspensão de eritrócitos e, essa mistura acima foi incubada por 2 h a 37 °C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.1 Isolamento da lectina de *L.ferrea*

A obtenção da lectina de *L. ferrea* envolveu extração em solução salina (NaCl) a 0,15M, fracionamento com sulfato de amônio (0-80%) e uma cromatografia de afinidade com matriz quitina. A F0-80 dialisada foi escolhida por apresentar maior rendimento e 2,5 vezes de purificação em relação ao extrato bruto. O protocolo realizado foi previamente estabelecido por XIMENES et al. em 2004. Os resultados obtidos estão representados na **Tabela 1**, que apresenta o sumário de purificação da LifeFPL

Tabela 1 – Sumário da Purificação da LifeFPL

Amostras	Vol. (mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade hemaglutinante (AH)	Atividade hemaglutinante total	AH específica	Purificação
Extrato	57	43,2	2048	116736	47	1
F 0-80	20	17,4	2048	40960	117	2,5
LifeFPL	12	0,1	512	6144	5120	22

1.2 Atividade Coagulante na presença do caolin

A LifeFPL, também apresentou resultado positivo, observando-se, no teste de Coagulação com o caolin (composto coagulante), um resultado similar a aquele obtido para o controle positivo, sulfato de alumínio, que normalmente é utilizado como coagulante no tratamento da água (Figura 1).

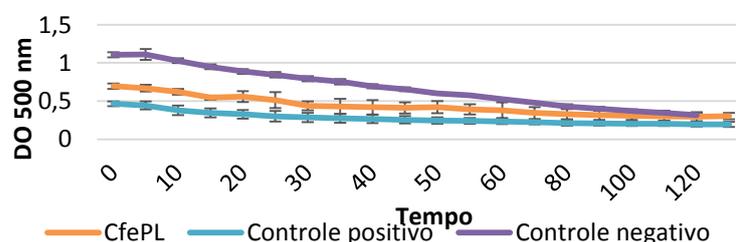


Figura 1: Atividade coagulante de LifeFPL em água tratada com caolin. Os valores representam a média de três ensaios (\pm desvio padrão) diferenças significativas entre os grupos foram determinadas pelo $p < 0,05$.

1.3 Difusão Radial

Foi observado linhas de precipitações no gel indicando que o extrato bruto, fração e LifeFPL (Figura 2) se ligaram ao ácido húmico nas concentrações testadas (100 e 200 mg/L de carbono).

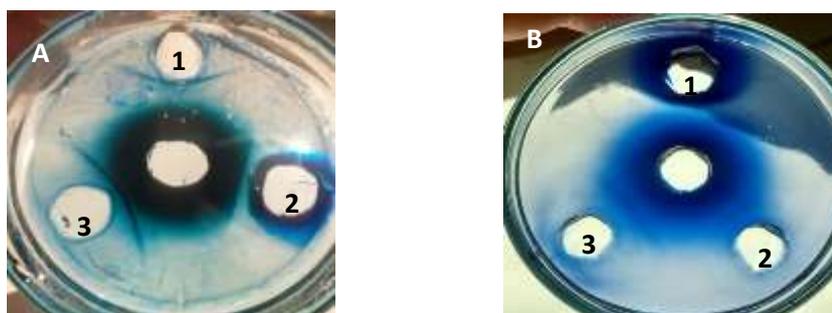


Figura 2: Difusão Radial. Placas de Petri com gel de agarose. 5A- poço central contém ácido húmico na concentração 200 mg/L; 5A1: Fração; 5A2: Extrato e 5A3 LifeFPL. 5B- poço central contém ácido húmico na concentração 100 mg/L; 5B1: Fração; 5B2: Extrato e 5B3 LifeFPL.

1.5 Atividade Hemolítica

Foi realizado o teste hemolítico com a LifeFPL contra diferentes tipos sanguíneos humanos do sistema ABO. Observou-se que LifeFPL não foi hemolítica para a maioria dos tipos sanguíneos testados, até mesmo na concentração de 1 mg/mL. Somente no teste realizado para o grupo sanguíneo do tipo O foi observada hemólise a partir da concentração de 500 µg/mL (Figura 3).

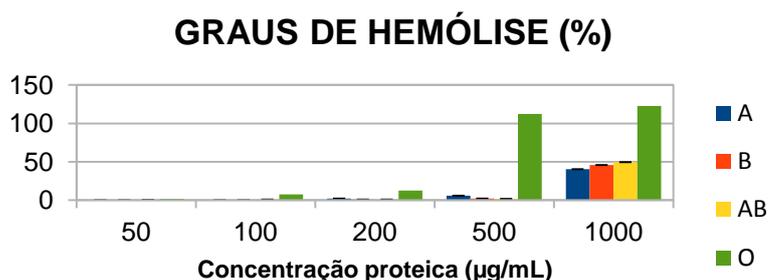


Figura 3: Atividade hemolítica. Graus de hemólise de LifeFPL, em diferentes concentrações, contra os grupos sanguíneos do sistema ABO. O desvio padrão $\rho < 0,05$.

CONCLUSÕES

As vagens de *L. ferrea* possuem uma proteína com atividade hemaglutinante, a qual sua purificação e obtenção foi dada pela cromatografia de afinidade. A LifeFPL apresentou resultado positivo no teste de coagulação em comparação com o sulfato de alumínio. A lectina não apresentou atividade hemolítica para o sistema ABO, exceto para o grupo sanguíneo O, que em concentrações maiores que 500 µg/mL apresentou atividade hemolítica.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, à PROPESQ, à UFPE. À minha professora orientadora Maria Tereza dos Santos Correia e à Carlos Eduardo Sales da Silva por toda sua paciência e compreensão.

REFERÊNCIAS

- 1 - XIMENES, N. C. A. **Purificação e Caracterização da Lectina da Vagem de *Caesalpiniaferrea* (CfePL): Aplicação Biológica.** Recife: UFPE, 2004. (Dissertação para obtenção do título de Mestre em Bioquímica – Departamento de Bioquímica – Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco), 53 p.
- 2 - GHEBREMICHAEL, K. A.; GUNARATNA, K. R.; HENRIKSSON, H.; BRUMER, H.; DALHAMMAR, G. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringaoleifera* seed. **Water Research**, v. 39, p. 2338-2344, 2005.
- 3 - LORENZI, H., MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil, Nativas e Exóticas.** Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 512, 2002
- 4 - SILVA, L. C. N.; ALVES, N. M. P.; CASTRO, M. C. A. B.; PEREIRA, V. R. A.; PAZ, N. V. N.; COELHO, L. C. B. B.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; CORREIA, M. T. S. **Immunomodulatory effects of pCramoll and rCramoll on peritoneal exudate cells (PECs) infected and non-infected with *Staphylococcus aureus*.** **International Journal of Biological Macromolecules**, V.72, p.848-854, 2015.