

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO DE FOLHAS DE *Bauhinia forficata*

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

¹Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Proteômica – CDTEC/UFPEL Campus Universitário – Caixa postal 354 – CEP 96010-900. ²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – UFPEL.
csilveira.cdtec@ufpel.edu.br

1 INTRODUÇÃO

Bauhinia forficata é uma planta arbórea, pertencente à família botânica Fabaceae, conhecida popularmente como “pata-de-vaca”. É a espécie de *Bauhinia* mais utilizada no Brasil como planta medicinal antidiabética (JORGE et al., 2004). Esta espécie é nativa do sul do Brasil e pode ser encontrada do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul (MIYAKE et al., 1986). A infusão de suas folhas é utilizada na medicina popular brasileira como agente diurético, hipoglicemiante, tônico, depurativo, no combate à elefantíase e na redução da glicosúria (MARTINS et al., 1998).

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas que possuem sítios ativos para glicídeos, com um ou mais sítios de ligação por subunidade. Estas moléculas se ligam seletiva e reversivelmente aos carboidratos e precipitam polissacarídeos, glicoproteínas e glicolipídeos, agem como reconhecedoras de células (SINGH et al., 1999). Inicialmente encontradas em plantas, porém, as lectinas já foram isoladas em vírus, bactérias e animais (LIS; SHARON, 1998; LORIS, 2002).

As propriedades biológicas das lectinas, especialmente as de vegetais, estão sendo amplamente estudadas (PINTO et al., 2008; KAUR et al, 2006; SINGH et al., 1999). Porém, até o presente momento, não existem estudos realizados a respeito da purificação e caracterização de lectinas provenientes de extratos de folhas de *B. forficata*. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar extratos de folhas de *B. forficata* quanto à presença de lectinas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Extração das lectinas de *B. forficata*

Folhas frescas de *B. forficata* Link. foram coletadas no município de Capão do Leão – RS e lavadas com água destilada, trituradas com N₂ líquido mecanicamente em gral e pistilo, o extrato foi obtido após ficar em agitação durante a noite em uma concentração de 10% (p/v) em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 7,6) com NaCl 0,15 M ou tampão citrato-fosfato com NaCl 0,15 M. O extrato bruto foi centrifugado a 10149 g por 15 min a uma temperatura de 4°C. Foi submetido a precipitação 0-60% (p/v) com sulfato de amônio por no mínimo 4h em temperatura ambiente e após foi centrifugado sob as condições já citadas. Todo material precipitado ficou retido no *pellet*, e este foi dialisado contra água destilada, seguido pelo tampão Tris (pH 7,6) com 0,15M de NaCl.

Atividade hemaglutinante

Para a realização do teste de hemaglutinação as amostras de sangue foram obtidas de coelhos saudáveis, e após a coleta foram imediatamente misturadas com uma solução anticoagulante, heparina. Os eritrócitos foram lavados por quatro vezes com tampão Tris-HCl pH 7,6 mais NaCl 0,15M.

Elektroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%)

As amostras após diálise foram submetidas a eletroforese de poliacrilamida em gel de 12% (SDS-PAGE). A corrida eletroforética foi realizada por 2 horas sendo utilizado o Marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen) para a confirmação da massa molecular das proteínas no gel. Foram aplicadas 15µL de amostra em cada poço, correndo-se o gel inicialmente a 70 V e depois aumentando-se para 120V. O gel foi corado com *Coomassie brilhante Blue* e descorado.

Para a confirmação da presença da lectina as amostras foram submetidas a análise por *Western-blotting*, utilizando-se anticorpos policlonais Anti-BVL (Lectina de *Bauhinia variegata*). Para o controle foi utilizado lectina purificada de semente de *B. variegata* L. (PINTO et al., 2008). Após a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose procedeu-se o bloqueio da membrana com 5% (p/v) de leite em pó desnatado em tampão PBS-T (tampão fosfato salino com 0,05% de Tween 20). Após o bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpo anti-BVL produzido em coelho (1:200, PBS-T). Para a revelação a membrana foi incubada novamente com anticorpo monoclonal anti-anticorpo de coelho conjugado com peroxidase e substrato diaminobenzidina (DAB).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato com maior rendimento na extração da lectina foi obtido em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 7,6) com Cloreto de sódio 0,15 M. A atividade hemaglutinante foi confirmada tanto no extrato bruto quanto na fração precipitada com sulfato de amônia dialisada.

A imagem do gel de poliacrilamida 12% de frações coletadas do extrato bruto, revela um sinal expressiva com massa molecular em torno de 19 kDa (Fig. 1-a) que provavelmente seja uma lectina, já que na análise por *Western-blotting* esta banda reagiu com o anticorpo anti lectina de *B. variegata*. Em estudos precedentes, Coelho e Silva (2000) encontraram nas folhas de uma outra espécie do mesmo gênero (*Bauhinia forficata* Link.), lectinas com massa molecular aparente de 33 kDa. Diferentes padrões eletroforéticos dos extratos confirmam a variedade dessa família de proteínas e indicam que elas podem ser tecido-específicas, o que pode ser fonte para variabilidade em suas aplicações biotecnológicas, devido a possíveis mudanças em seus sítios de ligação.

De acordo com os resultados obtidos no SDS-PAGE (Fig. 1-a) e no *Western-blotting* (Fig. 1-b) o extrato bruto apresentou mais um sinal depois da precipitação com o sulfato de amônio, o que sugere a existência de mais de uma lectina nas folhas de *B. forficata*, podendo elas serem produtos de diferentes genes ou diferentes produtos do mesmo gene.

Também é possível que a lectina de *B. forficata* (BFL) tenha grande semelhança com outras lectinas do mesmo gênero já que foi reconhecida pelos

anticorpos produzidos contra a proteína nativa de sementes de *B. variegata* (Pinto et al., 2008).

É importante ressaltar que o gene de uma lectina de *B. forficata* foi isolado e expresso em *Escherichia coli* por Camacho e colaboradores (2006). O estudo dessas espécies pode propiciar pesquisas futuras de comparação entre estruturas para essas proteínas de tecido-específico contribuindo para elucidar a sua função, já que elas podem ser produtos de genes homólogos.

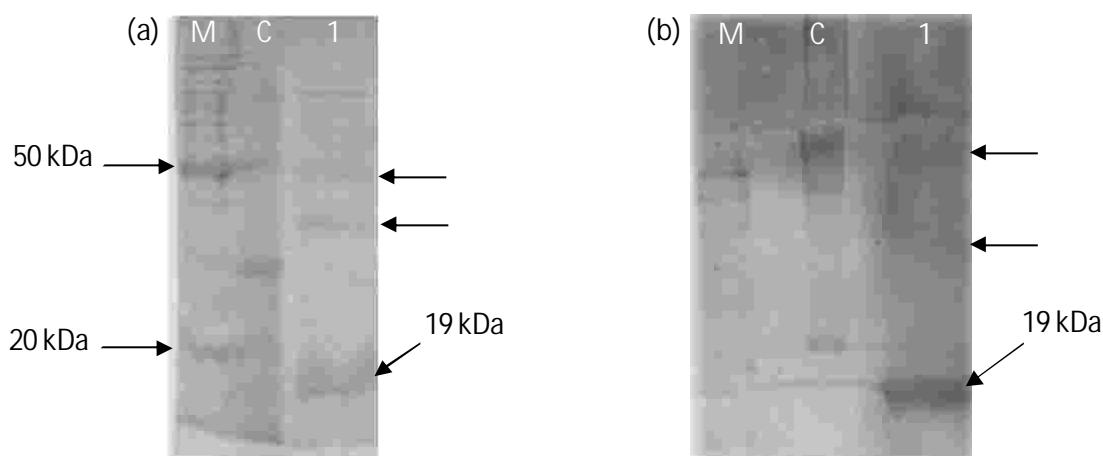


Figura 1: (a) Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) na presença de SDS e 2-mercaptoetanol das lectinas BFL. M: marcador *BenchMark™ Protein Ladder*, C: Lectina de *B. variegata*, 1: Extrato bruto de folhas *B. forficata* após precipitação e dialise. (b) *Western-blotting* do extrato bruto das folhas de *Bauhinia forficata*. M: marcador pré-corado *BenchMark™ Protein Ladder*, C: controle, 1: BFL folhas.

4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, fica evidente a presença de uma lectina putativa de aproximadamente 19 KDa no extrato de folhas da *B. forficata*, contudo, estudos posteriores serão realizados para seu isolamento e sua completa caracterização.

5 REFERÊNCIAS

JORGE, A. P.; HORST, H.; SOUSA, E.; PIZZOLATTI, M. G.; SILVA, F. R. M. B.; Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ¹⁴C-glucose uptake in rat soleus muscle. **Chemico-Biological Interactions**, v. 149, p. 89-96, 2004.

KAUR, M.; SINGH, K.; RUP, P. J.; KAMBOJ, S. S.; SAXENA, A. K.; SHARMA, M.; BHAGAT, M.; SOOD, S. K.; SINGH, J. A tuber lectin from *Arisaema jacquemontii* Blume with anti-insect and anti-proliferative properties. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.39, n.4, p.432-440, 2006.

LIS, H.; SHARON, H. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v.98, n.2, p.637-634, 1998.

LORIS, R. Principles of structure of animal and plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1572, p.263-273, 2002.

MARTINS, R. E.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E.; **Plantas Mediciniais**, Ed. UFV: Viçosa, p. 155, 1998.

MIYAKE, E. T.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. Pharmacognostic characterization of Pata-de-Vaca (*Bauhinia forficata*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 1, n. 1, p. 56-68, 1986.

PINTO, L.; NAGANO, C. S.; OLIVEIRA, T. M.; MOURA, T. R.; SAMPAIO, A. H.; DEBRAY, H; PINTO, V. P.; DELLAGOSTIN, O. A.; CAVADA, B. S. Purification and molecular cloning of a new galactosespecific lectin from *Bauhinia variegata* seeds. **Journal of Biosciences**, v. 33, p. 355-363, 2008.

SINGH R. S.; TIWARY A. K.; KENNEDY J. F. Lectins: sources, activities, and applications **Critical Reviews in Biotechnology**, v.19, n.2, p.145-178, 1999

Camacho, Natália Neutzling ; PINTO, L. S. ; DELLAGOSTIN, Odir Antonio . Clonagem, expressão e purificação da lectina de *Bauhinia forficata* em *Escherichia coli*. In: XV Congresso de Iniciação Científica e VIII Encontro de Pós-Graduação, 2006, Pelotas. XV Congresso de Iniciação Científica e VII encontro de Pós-Graduação, 2006.