

PRODUÇÃO DE MATRIZES PARA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE A PARTIR DE POLISSACARÍDEOS VEGETAIS

INTRODUÇÃO

Os métodos de separação de misturas de diferentes componentes mediante a utilização de fases são conhecidos como cromatografias (CARDONA; MUÑOZ, 2016). O início da utilização da cromatografia como método de separação data de 1903, ocorrendo o seu posterior desenvolvimento e evolução a partir de 1930. A primeira pessoa a definir o termo cromatografia foi o botânico russo Miguel Tswett (1872- 1913) no ano de 1906, escolhendo esse termo das palavras gregas *khromatos* (cor) e *graphein* (escrita) para descrever a separação dos pigmentos de plantas em diferentes zonas coloridas.

Atualmente, o termo cromatografia tem sido utilizado para o isolamento também de compostos incolores, permitindo o isolamento de proteínas através de sua afinidade por outras biomoléculas, como os carboidratos.

A cromatografia de afinidade é uma técnica tradicional para purificação de proteínas, que têm a capacidade de se ligar não-covalentemente e reversivelmente a moléculas específicas conhecidas como ligantes. A utilização de suportes do tipo membrana, utilizando polímeros sintéticos ou naturais, tais como celulose, quitosana, poliamida, poli (álcool vinílico), poli (metacrilato de hidroxietila) e polisulfona têm sido investigadas (VYAS et al., 2001; SRIVASTAVA et al., 2012; LV et al., 2013).

Esse método difere das técnicas de cromatografia clássica pela proteína conseguir ser separada com base em alguma de suas propriedades bioquímicas. Em cromatografia de afinidade, o ligante está ligado covalentemente à matriz, que deve ser quimicamente inerte, porosa e além de ter uma variedade de grupos funcionais adequados para acoplamento com proteínas diferentes.

Dentre as proteínas com essa capacidade em especial, as lectinas são um grupo que tem como característica principal ligar-se a carboidratos. As lectinas, por serem proteínas bioativas capazes de “decifrar os glicocódigos” codificados na estrutura dos glicoconjugados, desempenham um papel fundamental em muitos processos biológicos, tais como comunicação celular, resposta imunológica, fertilização, desenvolvimento de infecções parasitárias e metástase de tumores (GABIUS; GABIUS, 1997).

A habilidade para o reconhecimento e ligação a carboidratos específicos distinguem as lectinas de todas as outras proteínas de plantas. Elas são classicamente consideradas um grupo heterogêneo de proteínas, pois apresentam propriedades bioquímicas e atividades biológicas acentuadamente diferentes, distintas estruturas moleculares e especificidades (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Muitas funções têm sido propostas para as lectinas, tais como proteção contra patógenos e insetos, transporte e armazenamento de carboidratos, reconhecimento celular (dentro da célula, entre células ou entre organismos), proteínas de reserva ou reguladores de crescimento (PUSZTAI, 1991).

Em geral, as lectinas possuem propriedades bioquímicas e de ligação, que são muito convenientes para sua purificação por cromatografia de afinidade utilizando matrizes com polímeros, de origem natural ou sintética, que possuam seus carboidratos específicos.

Os polímeros sintéticos, apesar da alta produção, têm algumas desvantagens tais como elevado custo, toxicidade, promovem a poluição ambiental durante a síntese e geralmente são obtidos de fonte não renovável (JANI et al., 2009; DEOGADE et al., 2012). Já as gomas e mucilagens são naturais, biodegradáveis, biocompatíveis, atóxicas e apresentam boa relação custo-benefício (BHARDWAJ et al., 2000; YEOLE et al., 2006; DEOGADE et al., 2012).

Matrizes cromatográficas podem ser produzidas por meio da reticulação de polissacarídeos vegetais. Os polissacarídeos são polímeros naturais, os quais podem ser constituídos de um único ou de diferentes tipos de monossacarídeos. Celulose, alginato e goma arábica são exemplos de homo-, co-, e hetero- polissacarídeos, respectivamente. Nas plantas superiores estes podem ser obtidos de exsudatos, sementes, frutos e tubérculos

Os polissacarídeos de sementes podem ser divididos em de reservas ou estruturais. Os de reservas são os mais utilizados industrialmente. Esses polissacarídeos incluem galactomananas, xiloglucanas, glucanas e mananas, mas as duas primeiras destacam-se em aplicações industrial (BUCKERIDGE et al., 2000). Polissacarídeos de exsudatos são produzidos como mecanismo de defesa das plantas contra o estresse causado por injúrias físicas ou ataque microbiano. Esses polissacarídeos são heteropolissacarídeos complexos, ramificados e polidispersos. Ácidos carboxílicos, como ácido glucurônico e galacturônico, estão sempre presentes (CUNHA; PAULA; FEITOSA, 2009)

A reticulação do polissacarídeo consiste na formação de uma rede, onde as várias cadeias de um polissacarídeo são ligadas por ligações covalentes, tornando essas cadeias mais rígidas (GANJI; VASHEGHAMI-FARAHANI, 2009) e em geral são promovidas por agentes de reticulação, os quais são substâncias que apresentam baixa massa molar e grupos funcionais reativos capazes de permitir a formação de ligações inter ou intracadeias poliméricas (BERGER et al., 2004). Na reticulação química um número pequeno de ligações cruzadas entre as cadeias é suficiente para impedir sua separação e passagem para a solução, tornando assim o polímero insolúvel; observa-se que apenas uma ligação entre duas cadeias já é suficiente para que isso ocorra (LUCAS et al., 2001).

A descoberta e a produção de novas matrizes cromatográficas a partir de polissacarídeos vegetais são de grande importância, uma vez que são ferramentas fundamentais para que novas proteínas, como as lectinas, possam ser purificadas a partir de suas diferentes especificidades por carboidratos, com um custo mais baixo e menores danos ao meio ambiente.

OBJETIVOS E METAS A SEREM ALCANÇADOS

Este projeto tem por objetivo geral a produção a baixo custo de matrizes de cromatografia de afinidade produzidas a partir de polissacarídeos obtidos de exsudatos e sementes de plantas. Tendo como objetivos específicos e metas os pontos abaixo:

- Extrair polissacarídeos das sementes e exsudatos de plantas encontradas na região da Chapada do Araripe, Ceará;
- Realizar a reticulação dos polissacarídeos por diferentes metodologias, utilizando epícloridrina, tetraborato de sódio, formaldeído e/ou glutaraldeído como agentes reticulantes;
- Preparar pelo menos 04 (quatro) matrizes cromatográficas;
- Avaliar a capacidade das matrizes produzidas em reter lectinas;
- Utilizar as matrizes cromatográficas obtidas para purificação de lectinas vegetais.

METODOLOGIA A SER EMPREGADA

Material vegetal

As sementes e os exsudatos vegetais utilizados neste projeto serão coletados de plantas encontradas na região da Chapada do Araripe, Ceará, principalmente nas cidades de Crato, Barbalha, Missão Velha e Brejo Santo. Exsiccatas das espécies coletadas serão produzidas e depositadas no Herbário da Universidade Federal do Cariri – UFCA, localizado no Centro de Ciências Agrárias e da Biodiversidade – CCAB.

Extração e precipitação

Os polissacarídeos podem ser obtidos puros mediante extração aquosa após o endosperma ser separado do embrião. Esse processo pode ser realizado pela fervura das sementes em água ou álcool até que a separação manual dos componentes da semente seja possível (BUCKERIDGE; DIETRICH; LIMA, 2000).

Após aquecimento das sementes em água fervente, por 20 minutos, seguido por intumescimento, em água, por uma noite. O endosperma, após separação do tegumento e embrião da semente, será lavado, moído em liquidificador (10 minutos) e extraído com água a temperatura ambiente. O extrato obtido será tratado com etanol (3 volumes). O precipitado obtido será redissolvido em água, reprecipitado com 3 volumes de etanol e o precipitado final, liofilizado.

Reticulação

A reticulação dos polissacarídeos, processo também denominado de reação de entrecruzamento, é um tipo de modificação química que visa unir suas cadeias poliméricas, ou ainda, ligar suas cadeias às de outros polímeros gerando redes poliméricas híbridas. Agentes de reticulação são substâncias que apresentam baixa massa molar e grupos funcionais reativos capazes de permitir a formação de ligações inter ou intracadeias poliméricas (BERGUER et al., 2004)

Desta forma, serão utilizadas metodologias de reticulação identificadas a partir de um levantamento bibliográfico dos trabalhos que utilizaram a epícloridrina, tetraborato de sódio, formaldeído e/ou glutaraldeído como agentes reticulantes.

Rendimento

O rendimento da matriz cromatográfica produzida será avaliado a partir da massa de matriz obtida após a reticulação em relação à massa inicial de polissacarídeos obtidos após a extração, precipitação e secagem.

Cromatografia de afinidade

Para avaliar a capacidade de retenção de lectinas, colunas cromatográficas serão montadas com as matrizes reticuladas. Serão aplicados extratos de plantas que comprovadamente apresentem atividade lectínica, identificados através de um levantamento bibliográfico. As amostras serão sempre aplicadas em excesso, de modo a melhor se poder avaliar a capacidade de retenção das matrizes.

A pureza das lectinas obtidas será determinada por eletroforese em gel de poli(acrilamida em presença de SDS, seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970).

PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS, TECNOLÓGICAS OU DE INOVAÇÃO DA PROPOSTA

Os métodos de cromatografia de afinidade se baseiam na propriedade exibida por muitas moléculas de se associar seletivamente com moléculas complementares específicas, frequentemente denominadas de seus ligantes. Uma característica das proteínas é sua habilidade de estabelecer ligações fortes, embora reversíveis, com seus ligantes. Assim, esta técnica torna possível o isolamento e purificação de proteínas moléculas com base em suas propriedades biológicas.

As lectinas são proteínas com a propriedade particular de interagir específica e reversivelmente com carboidratos e glicoconjugados, sem promover modificações químicas na estrutura covalente dos mesmos. A atividade das lectinas pode ser inibida por mono- ou oligossacarídeos solúveis, pelos quais apresenta especificidade, revelando estar intimamente ligada à interação lectina-carboidrato. Assim, a melhor maneira de isolar lectinas tem sido, nas últimas décadas, a cromatografia de afinidade em matrizes contendo seus carboidratos ligantes. Estes ligantes, covalentemente ligados a matrizes inertes e hidrofílicas, permitem isolar a lectinas a partir de extratos dos mais diversos organismos.

Em função do exposto, o presente projeto de pesquisa contribui para um melhor entendimento dos estudos de produção de matrizes de cromatografia de afinidade a partir de carboidratos de origem vegetal, com baixo custo e de forma menos danosa para o meio ambiente.

Assim, é esperado que ao final da realização deste projeto tenha-se produzido pelo menos 04 (quatro) matrizes cromatográficas a partir de sementes e/ou exsudatos vegetais.

Quanto a formação de recursos humanos, espera-se que sejam publicados pelo menos 2 artigos científicos em revistas especializadas da área, sejam elaborados pelo menos 2 trabalhos de conclusão de curso, referentes a cada aluno bolsista do projeto, além da participação e apresentação de resultados preliminares e finais nos encontros de Iniciação Científica da UFCA, em congressos e simpósios afins a área, como por exemplo os congressos nacional e/ou internacional da SBBq e o Congresso Nacional de Botânica.

CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DO PROJETO

ATIVIDADES	Meses											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
Revisão/atualização bibliográfica	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Coleta material vegetal	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Extração e precipitação			•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Reticulação dos polissacarídeos			•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Cromatografia de afinidade				•	•	•	•	•	•	•	•	•
Eletroforese das proteínas purificadas						•	•	•	•	•	•	•
Escrita e publicação de trabalho científico						•	•	•	•	•	•	•
Escrita de relatório final								•	•	•	•	•

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N. A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 57, p. 19-34, 2004.

BHARDWAJ, T. R.; KANWAR, M.; LAL, R.; GUPTA, A. Natural gums and modified natural gums as sustained-release carriers. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 26, p. 1025–1038, 2000.

BUCKERIDGE, M.S.; TINÉ, M.A.S.; SANTOS, H.P.; LIMA, D.U.. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, 12 (Edição Especial), p.137-162, 2000.

Cardona, J. & Muñoz, J. (2016). Phytochemical variability between Colombian accessions of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 7 (2) julio-diciembre, 39-49. Recuperado de:
<http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/1556/1903>

CUNHA, P. L. R.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 3, 649-660, 2009.

DEOGADE, U. M.; DESHMUKH, V. N.; SAKARKAR, D. M. Natural Gums and Mucilage's in NDDS: Applications and Recent approaches. **Int. J. PharmTech Res.**, v.4, p 799-814, 2012.

GABIUS, H.J.; GABIUS, S. Glycoscience. **Status and Perspectives**. Chapman & Hall, Weinheim, Germany. 1997.

GANJI, F.; VASHEGHAMI-FARAHANI, E. Hydrogels in controlled drug delivery systems. **Iran. Polym. J.**, v. 18, p. 63-88, 2009.

JANI, G. K.; SHAH, D. P.; PRAJAPATI, V. D.; JAIN, V. C. Gums and mucilages: versatile excipients for pharmaceutical formulations. **Asian J Pharm Sci.**, v. 4, p. 309-323, 2009.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. Caracterização de Polímeros – Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica. Série Instituto de Macromoléculas. Ed. e-papers, Rio de Janeiro, 2001, 366 p.

LV, Y.; BAO, X.; LIU, H.; REN, J.; GUO, S. Purification and characterization of calcium-binding soybean protein hydrolysates by $\text{Ca}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ immobilized metal affinity chromatography (IMAC). **Food Chem.**, v. 141, p. 1645–1650, 2013.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol**, v. 109, p. 347-352. 1995.

PUSTZAI, A. Plant Lectins. Cambridge University Press. 1991.

SRIVASTAVA, P.; RAUT, H. N.; WAGH, R. S.; PUNTAMBEKAR, H. M.; KULKARNI, M. J. Purification and characterization of an antioxidant protein (~16 kDa) from Terminalia chebula fruit. **Food Chem.**, v. 131, p. 141-148, 2012.

VYAS, P. V.; SHAH, B. G.; TRIVEDI, G. S.; RAY, P.; ADHIKARY, S. K.; RANGARAJAN, R. Characterization of heterogeneous anion-exchange membrane. **J. Membr. Sci.**, v. 187, p. 39- 46, 2001.

YEOLE, P. G.; NAKHAT, P. D.; GALGATTE, U. C.; BABLA, I. C. Design and evaluation of xanthan gum-based sustained release matrix tablets of diclofenac sod. **Indian J. Pharm. Sci.**, v. 68, p. 185-189, 2006.