



DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA BIOANALÍTICA DE *ligand fishing*, PARA A TRIAGEM DE MOLÉCULAS BIOATIVAS PRESENTES EM MATRIZES COMPLEXAS

Palavras-Chave: PLANTAS MEDICINAIS, XANTINA OXIDASE, *ligand fishing*, *Banisteriopsis caapi*, *Croton lechleri*

Autoras:

MARINA DE LORENA MUNIZ SURANI, FEQ, UNICAMP

Dra. MARILI VILLA NOVA RODRIGUES, CPQBA, UNICAMP

INTRODUÇÃO:

No organismo humano, há a presença de uma base nitrogenada chamada xantina, sendo esta também presente em alimentos. A xantina age como substrato para a enzima xantina oxidase (XO) formando ácido úrico e, conseqüentemente, espécies reativas de oxigênio (ROS) (MEDEIROS et al., 2017). Parte do ácido úrico produzido pelo metabolismo é eliminado do corpo pela urina, mas outra parte permanece no organismo e, o excesso de ácido úrico é caracterizado por inchaço, inflamação, dor nas juntas e, também doenças como Gota (HOSPITAL SÃO MATHEUS, 2019). Ainda hoje, o medicamento utilizado para a inibição da atividade da enzima xantina oxidase, e conseqüente diminuição da presença de ácido úrico no organismo, é o alopurinol. Entretanto, este apresenta diversos efeitos colaterais, sendo possível citar, dermatite alérgica, urticária, anemia, dor gástrica, insuficiência renal e cefaleia, por exemplo (INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS FARMANGUINHOS, 2006). Visando uma busca de novos fármacos à base de plantas medicinais, neste trabalho foram estudadas 2 plantas ricas em alcaloides: folhas de *Banisteriopsis caapi* e a seiva do *Croton lechleri* (FISCHER, 2016).

A ferramenta empregada na busca de moléculas ativas nestes extratos vegetais foi a técnica bioanalítica de *ligand fishing* (ou pesca de ligantes), utilizada na “pesca” de moléculas bioativas presentes no extrato. É uma técnica emergente no campo de separações realizadas por afinidade, que no caso, utilizou uma enzima, a xantina oxidase, como alvo proteico. Neste caso, a enzima é imobilizada na superfície das partículas magnéticas e incubada dentro do extrato vegetal. Após a incubação, os compostos com afinidade com a enzima se ligam com ela pelo sítio ativo, sendo possível separá-los dos não ligantes por meio de lavagens e eluições, como observado na Figura 1 (RODRIGUES, 2019).

Essa técnica é comprovada de ter alta eficiência, taxa de acerto, estabilização e confiabilidade (ZHUO, et al., 2016).

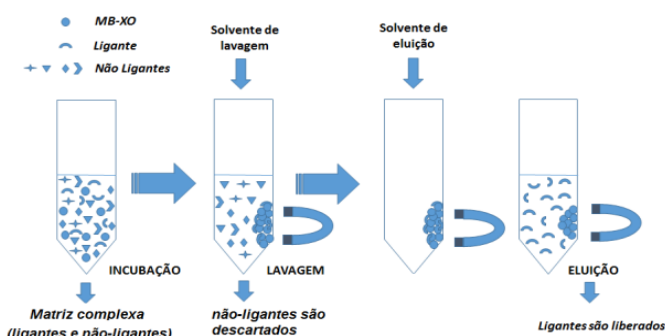


Figura 1: Desenho esquemático da técnica de *ligand fishing* - Fonte: RODRIGUES, 2019

METODOLOGIA:

Os extratos de *B. caapi* foi preparado utilizando a extração ácido-base de alcaloides (YUBIN et al., 2014). A acidificação, durante a extração líquido-líquido, faz com que os alcaloides (de caráter alcalino) sejam transferidos para a fase aquosa e a alcalinização os transfere para a fase orgânica e seca em rotaevaporador.

O extrato de *C. lechleri* foi extraído em meio acidificado e fracionado com solventes de diferentes polaridades. Estas frações foram secas em rotaevaporador.

Vale ressaltar que as plantas possuem taninos, e estes podem reagir com proteínas formando um complexo estável e insolúvel em água, levando à uma falsa interpretação em ensaios enzimáticos (RODRIGUES, 2019). Dessa maneira se faz necessário a remoção dos taninos antes dos ensaios enzimáticos, o que foi realizado através da retenção dos taninos em cartuchos de extração em fase sólida contendo poliamida (WALL et al., 1969).

A determinação da atividade enzimática e ensaio de inibição, foram feitos através da quantificação de ácido úrico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Também se fez importante as avaliações dos extratos em cromatografia de camada delgada (CCD), cromatografia a gás (CG) e por HPLC de maneira a definir o método para análise dos demais ensaios.

A imobilização da enzima XO em partículas magnéticas de óxido de ferro revestidas de sílica e modificadas com grupamento amino, foi realizada de acordo com VANZOLINI e colaboradores (2015) e o esquema está apresentado na Figura 2. Também foi preparado uma amostra controle (sem enzima).

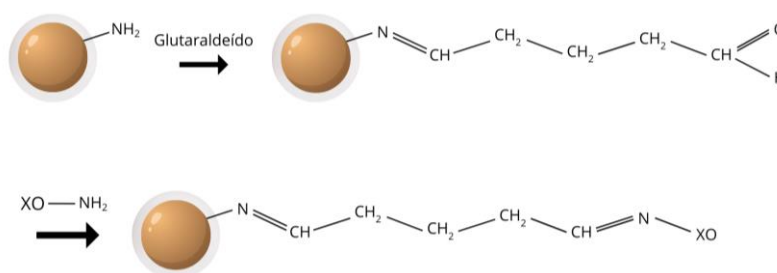


Figura 2: Reação da imobilização da enzima xantina oxidase em partículas magnéticas - Fonte: Elaboração própria

Em seguida foram realizadas análises utilizando o HPLC e, com o auxílio do mesmo, foi possível avaliar se a enzima estava imobilizada corretamente (sem impedimento de acesso ao sítio ativo) através da avaliação de sua atividade, ou seja, transformação de xantina (substrato) em ácido úrico (produto enzimático). O ensaio de atividade citado foi realizado diversas vezes ao longo do projeto para averiguar a atividade das enzimas imobilizadas (MB-XO) antes de ensaios que utilizam as mesmas.

O ensaio de inibição (NAGAO et al., 1999) foi realizado empregando-se a determinação do produto enzimático (ácido úrico) por HPLC, ou seja, quanto menor o pico maior a inibição. Foi realizada a reação entre as MB-XO com todas as frações de extratos em busca de encontrar, a maior porcentagem de inibição, calculada pela equação, $\% \text{ inibição} = \frac{1-AI}{AC} \cdot 100$, tal que AI e AC são as áreas dos picos de ácido úrico no ensaio com inibidor e controle, respectivamente.

Finalmente, o ensaio de *ligand fishing* (Wubshet, et al. 2015) foi realizado utilizando a fração de extrato com a melhor porcentagem de inibição obtida no ensaio previamente realizado. O ensaio conta com a realização de uma incubação das enzimas imobilizadas com a fração diluída a 2 µg/mL em tampão (S0). Assim, recolheu-se o sobrenadante (S1) por meio de separação magnética após 30 minutos de incubação, bem como realizou-se 3 lavagens com tampão enzimático, recolhendo os sobrenadantes (S2 - S4). Ademais realizou-se 3 eluições com solução 90% MeOH para, assim, obter os sobrenadantes (S5 - S7) para eluir os componentes que tiveram afinidade com os sítios ativos das enzimas. A ligação dos compostos fora do sítio ativo da enzima, pode ocorrer e isto é monitorado pela amostra controle, a partir dos cromatogramas obtidos por HPLC.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Após a imobilização das enzimas nas partículas magnéticas foi possível perceber que, nas amostras, após a adição do substrato xantina, as MB-XO demonstraram sua atividade, ao produzir, a partir do substrato fornecido, o ácido úrico, o que pode ser afirmado pelo aparecimento de um pico no mesmo tempo que o padrão. Ademais na amostra controle esse pico não apareceu, por não possuir a enzima e dessa maneira o ácido úrico não foi produzido, como pode ser observado na Figura 3. Já o ensaio de inibição apresentou as porcentagens de inibição para cada um dos extratos como apresentado

na Figura 4. Como a fração éter da *Croton lechleri* a maior porcentagem de inibição, a mesma foi selecionada para a realização do ensaio de *ligand fishing*.

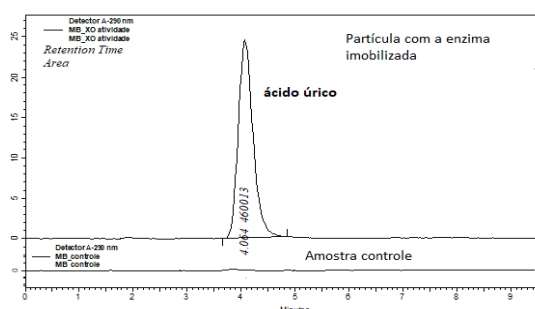


Figura 3: Exemplo de cromatograma de XO-MBs e do controle - Fonte: Elaboração própria

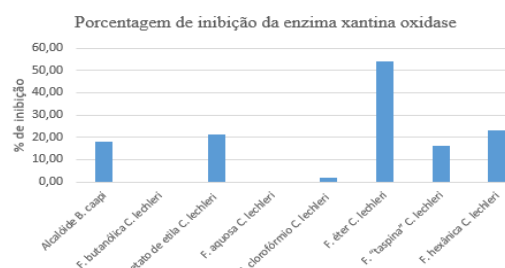


Figura 4: Resultados do ensaio de inibição - Fonte: Elaboração própria

A fração mais ativa, em termos de inibição da XO, foi a fração éter de *C. lechleri* (Figura 4), portanto a mesma foi selecionada para o ensaio de *ligand fishing*. Infelizmente, os resultados deste ensaio, a priori, não foram satisfatórios e deverá ser refeito futuramente. Porém, foi possível verificar a dinâmica do *ligand fishing* através do ensaio de validação deste experimento, o qual utilizou a mistura de um inibidor conhecido da XO, o febusostato e um não ligante, o aminoácido triptofano e o comportamento desta mistura nas várias etapas do *ligand fishing* considerando as partículas com a enzima ativa (Figura 5A) e não ativa (Figura 5B) apresentado a seguir.

Na Figura 5 é possível perceber que o ligante somente aparece nos cromatogramas após as eluições, pois é necessária uma solução mais forte para desprende-lo do sítio ativo da enzima. Enquanto, na amostra controle (sem a enzima), uma simples lavagem retira ligante e não ligante (Figura 5B).

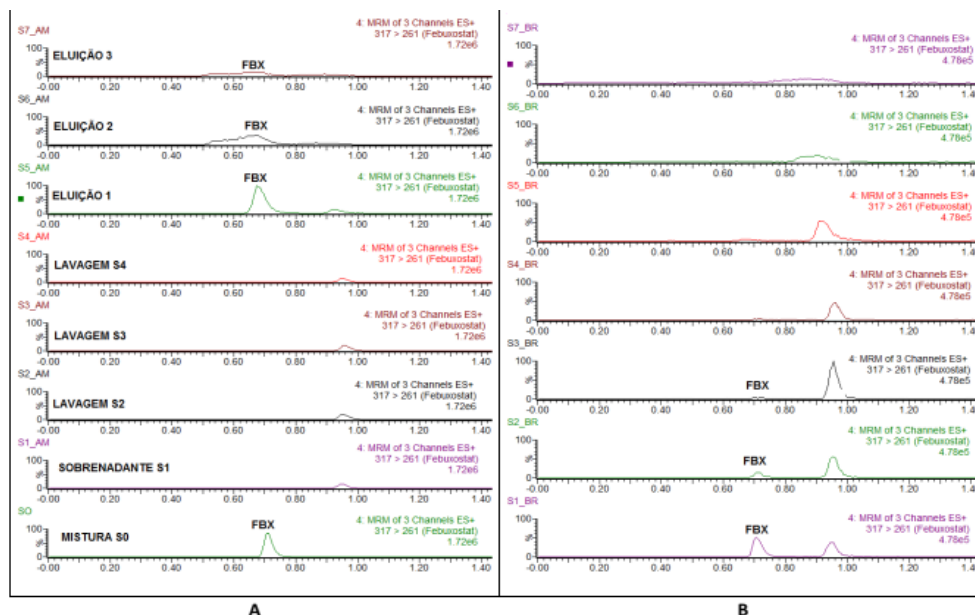


Figura 5: Cromatogramas da análise da mistura modelo. (A) Ensaio com as MB-XO e (B) Ensaio controle. - Fonte: RODRIGUES, 2019

A Figura 6 apresenta alguns dos resultados obtidos no ensaio de *ligand fishing* utilizando a fração éter como mistura em que se busca um composto ligante com os sítios ativos da enzima xantina oxidase. A principal diferença a se observar é a maior quantidade de picos que o cromatograma apresenta, a um comprimento de 230 nm. Isso se deve a complexibilidade da fração éter e, a maior quantidade de picos dificulta imensamente a análise. É possível perceber que há uma divergência entre a quantidade de picos entre os ensaios com a amostra com MB-XO e a amostra controle que, diferentemente do ensaio modelo citado anteriormente, possui a mesma fração éter em ambas as amostras, então essa divergência na quantidade de picos não é um resultado esperado. Por fim, os mesmos picos que foram observados nas eluições da amostra com as MB-XO foram observados nas eluições da amostra

controle, o que apresenta o resultado de que não foi encontrado um inibidor da enzima xantina oxidase nessa amostra, o que é um resultado que diverge do esperado para esta amostra visto que nas replicatas do ensaio de inibição, a porcentagem de inibição da fração éter na produção de ácido úrico foi de 54,03% em relação a produção de ácido úrico na amostra controle. Como no fim da terceira eluição (S7), ainda havia uma grande quantidade de picos, foram realizadas mais 3 eluições (S8-S10), o que não resultou em diferenças nos resultados discutidos anteriormente.

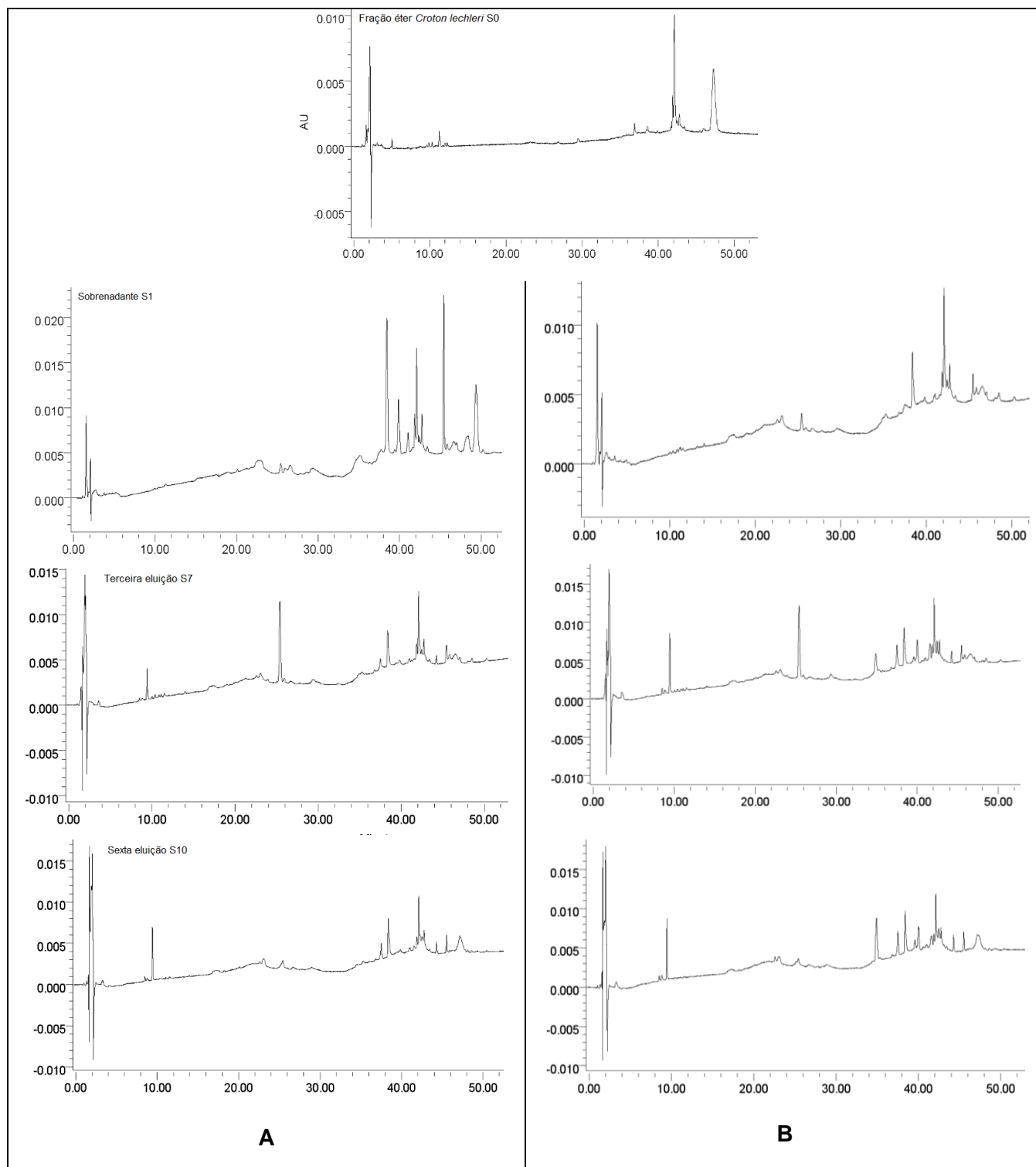


Figura 6: Cromatogramas do *ligand fishing* da fr. éter da *C. lechleri*. (A) Ensaio com MB-XO e (B) Ensaio controle - Fonte: Elaboração própria

CONCLUSÕES:

A técnica de imobilização da enzima xantina oxidase foi muito bem sucedida, pois a enzima continuou produzindo ácido úrico mesmo após os diversos ensaios serem realizados, comprovado pelos

ensaios de atividade de enzima realizados ao longo dos meses, em que a enzima perdeu um pouco de sua atividade, porém não desativou completamente. A fração éter da seiva da *Croton lechleri* obteve a melhor porcentagem de inibição no ensaio de inibição realizado e, assim, deve ser mais explorada, ou seja, o ensaio deve ser refeito num futuro próximo.

BIBLIOGRAFIA

FISCHER, D. **Alcalóides**, 2016. Disponível em: <https://bit.ly/44OoQHX>. Acesso em: 23 de mai. 2023

HOSPITAL SÃO MATHEUS. **Tudo sobre Ácido Úrico: o que é, sintomas e porque pode estar alto**, 2019. Disponível em: <https://bit.ly/3K2QqcF>. Acesso em: 11 de abr. 2023.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS FARMANGUINHOS. **ALOPURINOL**, 2006. Disponível em: <https://bit.ly/3Q0eYH5>. Acesso em: 23 de mai. 2023.

JONES K. **Review of sangre de drago (*Croton lechleri*)--a South American tree sap in the treatment of diarrhea, inflammation, insect bites, viral infections, and wounds: traditional uses to clinical research**. J Altern Complement Med. 2003 Dec;9(6):877-96. doi: 10.1089/107555303771952235.

MEDEIROS IG; SILVA C; ALCOFORADO I. **XANTINA E XANTINA OXIDASE DO ÁCIDO ÚRICO À GOTA**. REVISTA DE TRABALHOS ACADÊMICOS - UNIVERSO RECIFE, VOL. 4, NO 2-1 (2017).

MONTOPOLI et al. ***Croton lechleri* sap and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon cancer HT29 cell lines**. J Ethnopharmacol. 2012 Dec 18;144(3):747-53. doi: 10.1016/j.jep.2012.10.032.

MORALES-GARCIA et al. **The alkaloids of *Banisteriopsis caapi*, the plant source of the Amazonian hallucinogen Ayahuasca, stimulate adult neurogenesis *in vitro***. Publicado online 13 de jul 2017. doi: 10.1038/s41598-017-05407-9.

NAGAO A, SEKI M, KOBAYASHI H. **Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids**. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 1999;63(10):1787-1790

RODRIGUES M V N. **BUSCA DE INIBIDORES DA XANTINA OXIDASE EM AMOSTRAS DE ORIGEM VEGETAL EMPREGANDO DIFERENTES VERSÕES DA BIOCROMATOLOGIA**. 2019. (Relatório de pesquisa).

VANZOLINI KL, et al. **Acetylcholinesterase immobilized on modified magnetic beads as a tool for screening a compound library**. Microchimica Acta 2015; 182(13):2209-2213.

WALL M, et al. **Plant antitumor agents III: a convenient separation of tannins from other plant constituents**. Journal of Pharmaceutical Sciences. Volume 58; 1969. p 839-841.

WUBSHET et al. **Magnetic Ligand Fishing as a Targeting Tool for HPLC-HRMS-SPE-NMR: α -Glucosidase Inhibitory Ligands and Alkylresorcinol Glycosides from *Eugenia catharinae***. J. Nat. Prod. 2015, 78, 11, 2657–2665. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00603>

YUBIN, J. **The extraction, separation and purification of alkaloids in the natural medicine**. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2014, 6(1):338-345.

ZHUO, et al. **Ligand Fishing: A Remarkable Strategy for Discovering Bioactive Compounds from Complex Mixture of Natural Products**. Molecules. 2016 Nov; 21(11): 1516. doi: 10.3390/molecules21111516