

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

LUCIANA DUARTE MARTINS DA MATTA

**SULFATASE DE FÍGADO DO MOLUSCO *Aplysia cervina*
SOLÚVEL E IMOBILIZADA EM SUPORTES SÓLIDOS**

**RECIFE
2004**

LUCIANA DUARTE MARTINS DA MATTA

**SULFATASE DE FÍGADO DO MOLUSCO *Aplysia cervina*
SOLÚVEL E IMOBILIZADA EM SUPORTES SÓLIDOS**

**Tese apresentada ao Curso de Doutorado
em Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco, para obtenção
do título de Doutor em Ciências
Biológicas, área de concentração em
Biotecnologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Diz de Abreu**

SULFATASE DE FÍGADO DO MOLUSCO *Aplysia cervina*
SOLÚVEL E IMOBILIZADA EM SUPORTES SÓLIDOS.

LUCIANA DUARTE MARTINS DA MATTA

COMISSÃO EXAMINADORA
Membros Titulares

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior
Departamento de Bioquímica; LIKA - UFPE

Prof. Dr. Luiz Roberto Diz de Abreu
Departamento de Bioquímica - UFRN

Profa. Dra. Kátia Flávia Fernandes Silva
Departamento de Ciências Fisiológicas – UFG

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
Departamento de Bioquímica; LIKA - UFPE

Profa. Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva
Departamento de Bioquímica; LIKA - UFPE

Membros suplentes

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Departamento de Fisiologia e Morfologia; LIKA - UFRPE

Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha
Departamento de Bioquímica; LIKA - UFPE

Ao meu orientador, Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, os meus mais sinceros agradecimentos pela orientação, paciência, apoio e pela oportunidade de concluir este trabalho com certa rapidez, mas muita seriedade. OBRIGADÃO!!!

Ao meu marido Fernando, que tem me acompanhado durante todo esse tempo que estamos juntos, me apoiando nos maus momentos e me incentivando nos momentos certos, dando-me carinho, amor e compreensão. Obrigado por tudo. És realmente uma pessoa muito especial. Amo-te!

Aos meus pais maravilhosos José e Maria Dalva que criaram todos os filhos tentando sempre acertar e nos fez assim...Filhos agradecidos, amorosos e honrados pelos pais que possuem...Eu os amo muito!!!

Aos meus irmãos Clarice, Júnior, Fábio, Fabiana, Genêz e René, obrigado por tanta ajuda, incentivo e carinho, vocês são fantásticos!!!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
INTRODUÇÃO	1
JUSTIFICATIVA	29
OBJETIVOS	30
REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO I	49
Sulfatase from mollusc <i>Aplysia Cervina</i> liver: isolation, physicochemical and kinetics parameters	50
CAPÍTULO II	63
Immobilization of sulfatase from <i>Aplysia Cervina</i> liver on ferromagnetic polysiloxane/polyvinyl Alcohol	64
CAPÍTULO III	82
Immobilization of sulfatase from <i>Aplysia Cervina</i> liver on ferromagnetic Dacron	83
CONCLUSÕES GERAIS	99
PERSPECTIVAS	100
ANEXOS	101

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo que possuo, que crio, que sinto, que vivo, ou seja, pelo que sou!

Aos meus sobrinhos e sobrinhas: Jullyana, Mariana, Amanda, Gabriela, Gabriel, Rafael, Marina, Ana Beatriz, Carol, Carine, Rafael, Gabriel, Daniel, Tainá e Bruna por me fazerem lembrar que nosso lado criança nunca morre e que as coisas mais simples muitas vezes nos trazem muito mais alegria...Amo vocês todos!!!!!!

Aos meus cunhados, cunhadas (Patrícia e Alessandra) e sogra pelo estímulo, ajudas e amizade.

A Empresa Terphane LTDA pela doação das folhas de Dacron;

Aos membros da banca de qualificação: Prof. José Luiz de Lima Filho e Prof. Romildo Nogueira, pelas valiosas sugestões.

Ao Prof. Luiz Roberto Diz de Abreu da Universidade do Rio Grande do Norte por me fornecer os substratos e a cromatografia para a realização deste trabalho.

As Profas. Maria Elizabeth Cavalcante Chaves e Maria da Paz Carvalho da Silva pela convivência maravilhosa no laboratório e por tornar nosso ambiente de trabalho ainda mais harmonioso;

Ao Prof. José Luiz de Lima Filho, Diretor do LIKA, por nos auxiliar constantemente na resolução dos problemas diários;

A todos os funcionários do LIKA, Ilma, Conceição e principalmente Sr. Otaviano que nos dá um apoio técnico digno do maior respeito, como também a Verinha, Cleide e Paulo.

A Jace, Adenilda e Liane pelo auxílio constante resolvendo as pendências burocráticas no doutorado, o meu obrigado sincero, viu amores??!!!!

Aos amigos Givanildo, Luciana Oliveira, Ian e Teodora o meu muitíssimo obrigado por me receberem de braços abertos no laboratório de Bioquímica e me ajudarem tanto que nem sei como agradecer...Que Deus os retribua, da melhor

maneira possível, o que me deram. Vocês se tornaram para mim amigos verdadeiros!

À Camila e Rebecca pelo auxílio e ótima convivência, vocês são especiais;

Aos amigos e colegas: Eduardo Beltrão, Ranilson Bezerra, Mário Melo, Marina, Diego, Michele, Ana Acácia, Lília, Ana, Milena, Mariane, Marcela, Roseane, Marcília, Hercília, Jaqueline (ambas), Carol, Rosângela, Nanda, Lúcio (amigo metanol), Bruno, Carlos, Adriana, João, Simone, Daisy, Agenor, Fátima (Fatinha), Leilinha, Edílson, Silvana e Neide, pela amizade;

As amigas Ana Catarina, Danielly Brunaska e Mabel Calina, que souberam fazer meus dias ainda mais felizes aqui em Recife, obrigadão pela amizade e o carinho de vocês, nunca as esquecerei...

Ao pessoal dos laboratórios de biotecnologia, biologia molecular e patologia pelo auxílio;

Aos amigos do doutorado que dividiram comigo aqueles ótimos momentos durante a realização dos créditos... O meu abrigado pela convivência!

Ao Doutorado em Ciências Biológicas;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq pelo apoio financeiro;

Aqueles que não foram aqui citados, mas de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, não sintam que os esqueci por indiferença ou ingratidão, mas sim pelo esquecimento normal diante de tanto o que lembrar no término da tese. Sintam-se agradecidos, antes de tudo.

RESUMO

Uma sulfatase (EC 3.1.6.1.), heparina específica, foi identificada no fígado do molusco *Aplysia cervina*, largamente encontrado na costa nordestina do Brasil. Esta enzima foi purificada por precipitações sucessivas com sulfato de amônio e acetona e por cromatografia de afinidade em Heparina-Sepharose CL-6B. Algumas das propriedades físico-químicas e cinéticas desta preparação purificada 89,7 vezes (rendimento de 5,37%) foram investigadas usando o p-nitrofenil sulfato (pNFS) como substrato. Seus valores ótimos de pH e temperatura foram 5,0 e 45°C, respectivamente. Ela reteve mais de 90% de sua atividade quando incubada por 15 minutos a 45°C enquanto que perdeu 60% a 55°C. Seu K_m foi igual a $3,71 \pm 0,41$ mM. Sua atividade foi estimulada por $MgCl_2$, $CaCl_2$ e $FeCl_2$ e inibida por $Na_2S_2O_3$, Na_2SO_4 , KCl , $C_6H_5Na_3O_7$ (citrato de sódio), $HgCl_2$, Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4 . Heparina de baixa massa molecular competiu com o pNFS pelo centro ativo da enzima mais do que a de massa molecular elevada. Esta enzima foi covalentemente imobilizada ao Dacron e a uma rede semi-interpenetrada de polisiloxano e álcool polivinílico (POS/PVA), ambos magnetizados, resultando em derivados com atividade específica e retenção de 3,17 unidades/mg proteína, 1,85 unidades/mg proteína, 36,5% e 21,23%, respectivamente. Estas preparações foram removidas facilmente da mistura de reação por um campo magnético e foram reutilizadas diversas vezes sem perda de suas atividades. Elas foram mais termoresistentes do que a enzima solúvel e apresentaram o mesmo pH ótimo, temperatura ótima e K_m aparente. O derivado sintetizado com o Dacron ferromagnético apresentou uma vida útil mais elevada do que aquele em POS/PVA. O $MgCl_2$, $CaCl_2$ e EDTA ativaram ambos os derivados de sulfatase insolúveis em água enquanto que Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4 e a heparina inibiram. A ação pelos outros íons variou de acordo com o suporte.

Palavras chaves: Sulfatase, *Aplysia cervina*, enzima imobilizada, Dacron, polisiloxano, álcool polivinílico.

E-mail: ldmmatta@hotmail.com

ABSTRACT

A heparin specific sulfatase (EC 3.1.6.1.) was identified in the liver of the mollusc *Aplysia cervina*, widely found in the Northeastern Brazilian coast. This enzyme was purified by ammonium sulfate and acetone precipitations and by affinity chromatography using Heparin-Sepharose CL-6B. Some physical chemical and kinetics properties of this 89.7-fold purified preparation (5.37% yield) were investigated using p-nitrophenyl sulfate (pNPS) as substrate. The optima pH and temperature were found to be 5.0 and 45°C, respectively. This enzyme retained more than 90% of its activity when incubated for 15 min at 45°C while lost 60% at 55°C. k_m equal to 3.71 ± 0.41 mM was found. Its activity was enhanced by $MgCl_2$, $CaCl_2$ and $FeCl_2$ and inhibited by $Na_2S_2O_3$, Na_2SO_4 , KCl, $C_6H_5Na_3O_7$ (sodium citrate), $HgCl_2$, Na_2HPO_4 and NaH_2PO_4 . The heparin low molecular weight competed with pNPS for the active site enzyme more than the high molecular one. This enzyme was covalently immobilized on ferromagnetic polysiloxane/polyvinyl alcohol composite and Dacron yielding derivatives with specific activity and retention of 1.85 units/mg protein, 3.17 units/mg of protein, 21.23% and 36.5 %, respectively. These preparations were easily removed from the reaction mixture by a magnetic field and were reused several times without loss in their activities. They were more thermal stable than the soluble enzyme and presented the same optima pH and temperature and apparent K_m . The derivative based on ferromagnetic Dacron presented higher shelf life than that on POS/PVA. $MgCl_2$, $CaCl_2$ e EDTA activated both immobilized sulfatase derivatives whereas Na_2HPO_4 and NaH_2PO_4 and heparin inhibited them. The action by the other ions varied according to the support.

Key words: Sulfatase, *Aplysia cervina*, enzyme immobilization, Dacron, polysiloxane, polyvinyl alcohol.

E-mail: ldmmatta@hotmail.com