

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Mestrado em Bioquímica

Purificação e Caracterização da Lectina da Vagem de
Caesalpinia ferrea (CfePL): Aplicação Biológica

Neila Caroline de Araújo Ximenes

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Co-orientadoras: Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha

Recife, 2004

Neila Caroline de Araújo Ximenes

Purificação e Caracterização da Lectina da Vagem de
Caesalpinia ferrea (CfePL): Aplicação Biológica

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial
das exigências para a obtenção do título de Mestre em
Bioquímica pela Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovada por: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Profa. Dra. Patrícia Guedes Paiva
Profa. Dra. Sandra Rodrigues Souza

Fevereiro/2004

**O temor do SENHOR é o princípio de Sabedoria,
e o conhecimento do Santo é prudência.
Pv. 9. 10**

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

I. INTRODUÇÃO	1
I. 1 Lectinas	1
I. 1. 2 Purificação	3
I. 1. 3 Aplicações	5
I. 1. 4 Lectinas de Leguminosas	6
I. 1. 5 <i>Caesalpinia ferrea</i>	6
I. 2 Microrganismos	8
I. 2.1 Bactéria	8
I. 2. 2 Fungos	9
I. 3 Atividade Antimicrobiana	10
2. OBJETIVOS	12
2. 1 OBJETIVO GERAL	12
2. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
4. Artigo: Purification and Characterization of a <i>Caesalpinia ferrea</i> Thermostable Pod Lectin with Antimicrobial Activity	22
5. CONCLUSÕES	48
6. ANEXO	49

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por Ele estar sempre comigo em todos os momentos, por ter me escolhido para servi-lo e por estar me ensinando a viver neste mundo.

À Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia pela confiança, suporte e orientação

À Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho pelo incentivo, atenção, otimismo, por seus ensinamentos e co-orientação.

À Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha pela confiança, oportunidade e co-orientação.

À Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva pela atenção, apoio e incentivo.

A Coordenação e professores do Mestrado em Bioquímica e aos funcionários do Departamento de Bioquímica.

Ao Miron e a Neide pela amizade dedicada e apoio.

À Maria Barbosa Reis, pela amizade, carinho, ensinamentos, otimismo, compreensão e por tudo.

Ao João Virgílio, pela amizade e ajuda técnica.

Aos que fazem parte do Laboratório de Glicoproteínas, pela amizade, carinho, troca de conhecimentos, em especial a minha amiga Michele Dalvina por sempre está comigo nas horas alegres e tristes desta caminhada científica.

Aos meus pais, Nelson e Carmelita por todo amor, carinho, educação, apoio e confiança em todos os momentos, por sempre acreditarem em mim e por me ensinarem que servir a Deus é mais importante do que tudo.

Aos meus irmãos Nielson, Neilson e Rodrigo, a minha cunhada Patrícia e minha Tia Mércia, por estarem sempre torcendo por mim e dispostos a me ajudarem.

Ao Paulo Luiz, pelo incentivo, compreensão, amizade e amor.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

RESUMO

Lectinas são proteínas que se ligam reversivelmente e especificamente a carboidratos. *Caesalpinia ferrea* é uma planta com ampla distribuição no Brasil, sendo utilizada em medicina popular. Este trabalho teve como objetivo a purificação e caracterização de lectina da vagem de *Caesalpinia ferrea* (CfePL). Extrato da vagem (E) em NaCl 0,15 M foi submetido a purificação parcial com carvão ativado seguido de precipitação com sulfato de amônio (0 – 80%, F80). A Atividade hemaglutinante (AH) de E e F80 foram avaliadas usando diferentes eritrócitos. F80 foi cromatografada em coluna de quitina e lavada com NaCl 0,15 M, seguido de NaCl 1M; CfePL foi eluída com ácido acético 1 M (pH 4,0). AH de CfePL foi avaliada em presença de soluções de íons (Ca^{2+} e Mg^{2+}), diferentes valores de pH (2 – 12), por carboidratos, glicoproteínas e tratamento com diferentes temperaturas (30° – 100°C, 30 min). A massa molecular da proteína nativa foi determinada pelo sistema ÄKTAFPLC usando a coluna Sephacryl S-300; Preparações de CfePL foram avaliadas por PAGE para proteínas nativas ácidas e básicas, bem como, em condições desnaturantes e redutoras. Atividade antimicrobiana de CfePL foi avaliada com amostras de bactérias Gram-positivas (5) e Gram-negativas (3) ou fungo (4). CfePL não apresentou especificidade para eritrócitos humanos, eritrócitos de coelho (512^{-1}) foram escolhidos para avaliação de AH. AH de CfePL foi estimulada por íons (65536^{-1}) e diferentes valores de pH, a melhor AH (2048^{-1}) foi obtida com tampão citrato-fosfato (pH 4,5, 5,0, 5,5) e fosfato de sódio (pH 7,5), sendo quase totalmente abolida em pH 9,0 (2^{-1}). CfePL continuou ativa após aquecimento à 100°C, foi parcialmente inibida pelos carboidratos (manose, frutose, N-acetilglicosamina, trealose, ramnose, sacarose, galactose, fucose) e ovoalbumina, caseína, fetuína e glicoproteínas de soro de coelho, humano e fetal bovino. CfePL, uma proteína básica, apresentou uma banda principal por SDS-PAGE. Sistema ÄKTAFPLC revelou dois picos protéicos com 43 e 31 kDa. CfePL (1,5µg) inibiu o crescimento dos microrganismos testados; os melhores resultados (halo, 17 mm) foram com *Escherichia coli* e *Colletotrichum gloesporioides* e apresentou uma concentração mínima inibitória (CMI) de 10µg/ml frente a estes dois microrganismos. CfePL, purificada em quantidades de miligramas, foi um poderoso agente antimicrobiano de baixo custo, com amplo espectro de ação.

ABSTRACT

Lectins are proteins that bind specifically and reversibly to carbohydrates. *Caesalpinia ferrea* is a leguminous tree widely distributed in Brazil used in popular medicine. The aim of this work was the purification and characterization of *C. ferrea* pod lectin (CfePL). Pod extract (E) in 0.15 M NaCl was partially purified on activated charcoal followed by ammonium sulphate fractionation (0 – 80%, F80). Hemagglutinating activity (HA) of E and F80 were evaluated using different erythrocytes. F80 was chromatographed on chitin column and washed with 0.15 M NaCl followed by 1 M NaCl; CfePL was eluted with 1 M acetic acid (pH 4.0). CfePL HA was evaluated with ions (Ca^{++} and Mg^{++}), pH values (2 - 12), carbohydrates, glycoproteins and temperatures (30° - 100° C, 30 min). Molecular mass of native protein was determined in a ÄKTAFPLC system using a Sephacryl column; CfePL preparations were evaluated by PAGE for acidic and basic native protein, as well as under denatured and reduced conditions. CfePL antimicrobial activity was performed with strains of Gram-positive (5) and Gram-negative (3) bacteria or fungi (4). CfePL did not show specificity to human erythrocytes; rabbit erythrocytes (512^{-1}) were used to HA evaluation. CfePL HA was stimulated by ions (65536^{-1}); at different pH values, the best HA (2048^{-1}) were obtained with citrate-phosphate (pH 4.5, 5.0 and 5.5) and phosphate (pH 7.5) buffer, been almost abolished at pH 9.0 (2.0^{-1}). CfePL, active even after heating at 100°C, was partially inhibited by carbohydrates (threulose, fucose, N-acetyl-D-glucosamine, mannose, fructose, galactose, ramnose, saccharose) and ovalbumin, fetuin, casein and glycoproteins from rabbit, human and fetal bovine serum. CfePL, a basic protein, showed a main band by SDS-PAGE. ÄKTAFPLC system resolved two protein peaks with 43 and 31 kDa. CfePL (1,5µg) inhibited growth of tested microorganisms; best results (17 mm halo) were obtained with *Escherichia coli* and *Colletotrichum gloesporioides* and presented minimum inhibitory concentration (MIC) of 10 µg/ml for both microorganism. In conclusion, CfePL, purified in milligram quantities, was a powerful antimicrobial agent of low cost, with wide spectrum of action.