

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
MESTRADO EM BIOQUÍMICA**

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E  
IMOBILIZAÇÃO EM SEPHAROSE CL-4B DA LECTINA DE  
ENTRECASCA DE *Crataeva tapia* L.**

**REGINA MARIA SOUSA DE ARAÚJO**

**RECIFE, 2004**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
MESTRADO EM BIOQUÍMICA**

**REGINA MARIA SOUSA DE ARAUJO**

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E  
IMOBILIZAÇÃO EM SEPHAROSE CL-4B DA LECTINA DE  
ENTRECASCA DE *Crataeva tapia* L.**

Dissertação apresentada ao  
Mestrado em Bioquímica do Centro de  
Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Pernambuco, como parte dos  
requisitos exigidos para obtenção do  
título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva  
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

**RECIFE  
FEV/2004**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
MESTRADO EM BIOQUÍMICA**

**REGINA MARIA SOUSA DE ARAUJO**

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E IMOBILIZAÇÃO EM  
SEPHAROSE CL-4B DA LECTINA DE ENTRECASCA DE *Crataeva tapia* L.**

**Orientadora:** \_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

**Co-orientadora:** \_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

**Banca Examinadora:**

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Luana Cassandra Breintenbach Barroso

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Inês Sucupira Maciel

**Suplentes:**

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria do Socorro Mendonça Cavalcanti

**RECIFE, FEV/2004**

Deus quer, o homem sonha, a obra nasce.  
Fernando Pessoa

À minha mãe, que será sempre presença viva em minha vida, pela força que me deu mesmo no silêncio, mesmo na ausência... A minha gratidão, silenciosa e eterna, pelo teu amor e pelo teu sorriso que sempre de algum lugar me encoraja e me dá forças para prosseguir.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, razão de tudo. “Meu coração é para ti, Senhor, porque tu me destes a vida, o existir, o carinho e o amor”.

A Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva pela forma carinhosa que me acolheu, pela orientação científica maravilhosa, pelo apoio, atenção, confiança, incentivos e oportunidades constantes. Enfim, mais que uma orientadora, foi verdadeira amiga.

A Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia pela co-orientação, pela tranquilidade, confiança, apoio e amizade.

A Maria Barbosa Reis, pela dedicação, ensinamentos e por ter me oferecido a entrecasca com a qual pude desenvolver e obter os resultados deste trabalho.

Aos amigos que encontrei no Mestrado e no Laboratório de Glicoproteínas que fizeram a distância de casa e a rotina tornar-se menos árdua e mais alegre, pela amizade, companheirismo e apoio. Eu amo vocês!

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica pela dedicação, amizade ou pelo simples convívio que se fez presente nesta conquista. Em especial a Miron, Neide e João Vírginio.

Palavras não traduzem meu eterno e sincero agradecimento ao meu pai pelo amor, carinho, educação, respeito, compreensão e apoio em todos os momentos da minha vida. Hoje estou aqui devido à sua força e seu incentivo. Pai, nós vencemos!

A Luciano pelo seu amor, amizade, cumplicidade, carinho, compreensão, respeito e estímulo constantes. Encontro na minha conquista a sua presença.

Ao meu irmão, Henrique, e à minha família, em especial à Tia Ana Alice, que sempre me incentivaram a seguir em frente.

Aos meus amigos que mesmo distantes sempre me ajudaram e apoiaram.

A Érika e Líbia, companheiras maravilhosas que conviveram dia-a-dia comigo toda esta trajetória.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AH	Atividade hemaglutinante
AHE	Atividade hemaglutinante específica
CM	Carboximetil
CNBr	Brometo de cianogênio
Con A	Concanavalina A (lectina de <i>Canavalia ensiformis</i> )
CrataBL	Lectina da entrecasca de <i>Crataeva tapia</i>
DEAE	Dietilaminoetil
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
IgA	Imunoglobulina A
LCH	Aglutinina de <i>Lens culinaris</i>
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PEG 8000	Polietilenoglicol
PHA	Hemaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PNA	Aglutinina de amendoim
RIP-2	Proteína que inativa ribossomo tipo 2
SBA	Aglutinina de soja
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio
WGA	Aglutinina de gérmen de trigo

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Representação Esquemática de Aglutinação por Lectinas	2
Figura 2:	Visão Geral de <i>Crataeva tapia</i>	11

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b>	V
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	VI
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	VII
<b>SUMÁRIO</b>	VIII
<b>RESUMO</b>	IX
<b>ABSTRACT</b>	X
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Lectinas	1
1.1.1. Generalidades	1
1.1.2. Purificação e Caracterização	4
1.1.3. Propriedades Biológicas e Aplicações Biotecnológicas	8
1.2. <i>Crataeva tapia</i> L.	11
2. RELEVÂNCIA DO TRABALHO	12
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo Geral	13
3.2 Objetivos Específicos	13
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
5. ARTIGO “Purification in milligram quantities of <i>Crataeva tapia</i> bark lectin and its use as biospecific adsorbent for glycoprotein isolation”	24
6. CONCLUSÕES	49

## RESUMO

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune cuja ligação reversível e específica a carboidratos resulta em aglutinação celular. Estas proteínas, presentes em plantas, bactérias, invertebrados ou vertebrados, são detectadas por ensaio de hemaglutinação. *Crataeva tapia* L. pertence à família Capparaceae. Uma lectina de entrecasca de *C. tapia*, CrataBL, foi purificada à homogeneidade através de fracionamento com sulfato de amônio (Fração 30-60%), seguida por cromatografia de afinidade (gel de guar) ou troca iônica (CM-Celulose). CrataBL foi ativa com eritrócitos de humanos, galinha e coelho (atividade hemaglutinante específica, AHE, 102) e principalmente inibida por glicoproteínas. CrataBL foi termoestável e tratamento com EDTA não afetou a atividade hemaglutinante (AH); atividade não foi alterada após adição de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ . CrataBL migrou como uma única banda após eletroforese para proteínas nativas básicas e duas bandas polipeptídicas de massa molecular 21 e 40.000 Da após SDS-PAGE com ou sem agente redutor; os polipeptídeos foram também detectados sob o gel usando reagente para glicoproteína. A natureza glicoprotéica de CrataBL foi também revelada por sua interação com lectina glicose/manose sob gel de agarose. A massa molecular da lectina por cromatografia de gel filtração foi de 52.000 Da. CrataBL immobilizada em Sepharose CL-4B adsorveu bioseletivamente e purificou caseína, fetuína e ovoalbumina.

## ABSTRACT

Lectins are proteins or glycoproteins of non immune origin which reversible and specific carbohydrate binding results in cellular agglutination. These proteins are present in plants, bacteria, invertebrates or vertebrates and are detected by hemagglutinating assay. *Crataeva tapia* belongs to the Capparaceae family. A lectin from *C. tapia* bark, CrataBL, was purified to electrophoretic homogeneity by ammonium sulphate fractionation (30-60% fraction) and affinity (gum guar) or ion exchange chromatography (CM-Cellulose). CrataBL activity was obtained with human, chicken and rabbit erythrocytes (specific hemagglutinating activity, SHA = 102), which was mainly inhibited by glycoproteins. CrataBL was thermostable and EDTA treatment did not affect the HA; activity did not change after  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  addition. CrataBL migrated as a single band after electrophoresis to native basic proteins and two polypeptide bands of molecular mass 21,000 Da and 40,000 Da after SDS-PAGE with or without reducing agent; the polypeptides were also detected on gel using glycoprotein reagent. Glycoprotein nature of CrataBL was also revealed by its interaction with glucose/mannose lectin upon agarose gel. The lectin molecular mass by gel filtration chromatography was 52,000 Da. CrataBL immobilized on Sepharose 4B bioselectively adsorbed and purified casein, fetuin and ovalbumin.