

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

CONVÊNIO UFPE E UNIVERSIDADE DO VALE DO ACARAÚ

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E IMOBILIZAÇÃO
DA LECTINA DE PERICARPO DE *Punica granatum* L. EM
DACRON MAGNETIZADO.**

Mestranda: Cláudia Zeneida Gomes Parente Alves

Orientadora: Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Co-Orientadora: Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha

Recife, 2002

CLÁUDIA ZENEIDA GOMES PARENTE ALVES

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E IMOBILIZAÇÃO
DA LECTINA DE PERICARPO DE *Punica granatum* L. EM
DACRON MAGNETIZADO.**

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

Recife, 2002

Ata da defesa de dissertação da Mestranda Claudia Zeneida Gomes Parente Alves, realizada em 30 de agosto de 2002, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica

Às 14:15 minutos do dia 30 de agosto de 2002, foi aberto, no Auditório Prof. Marcionilo Barros Lins, Depto. de Bioquímica/CCB, o ato de defesa de dissertação da mestranda **Claudia Zeneida Gomes Parente Alves**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica/Convênio UFPE/UVA. Iniciando os trabalhos a Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães, Coordenadora do Curso supra citado, fez a apresentação da aluna, de sua orientadora, Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva, da Co-orientadora, Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha, e da Comissão Examinadora composta pelos professores doutores: Patrícia Maria Guedes Paiva, na qualidade de Presidente, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, Nicácio Henrique da Silva, os três do Depto. de Bioquímica e Maria Inês Sucupira Maciel, do Depto. de Ciências Domésticas da UFRPE. Após as apresentações, a Profa. Nereide Magalhães passou a palavra para a Sra. Presidente que convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: **"Isolamento, Caracterização Parcial e Imobilização da Lectina de Pericarpo de *Punica granatum* L. em Dacron Magnetizado**, e informou, que de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu a explanação e comentários acerca do tema em 30 (trinta) minutos. Após a apresentação a Sra. Presidente concedeu um intervalo de 10 minutos. Findo o intervalo, a mesma convidou a Comissão para ocupar seus lugares e passou a palavra ao primeiro examinador, Profa. Maria Inês Maciel, que agradeceu o convite, e fez alguns comentários, iniciando sua arguição. Ao final, a referida professora parabenizou a mestranda e sua orientadora, dando-se por satisfeita. Daí, a palavra foi passada para a Profa. Luana Coelho, que após agradecer e fazer alguns comentários, iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita, parabenizando a candidata e sua orientadora. Em seguida, a Sra. Presidente passou a palavra para o Prof. Nicácio Silva, agradeceu o convite, fez sugestões, e iniciou sua arguição. Finda a mesma, o referido professor parabenizou a candidata e sua orientadora. Daí, a Sra. Presidente usou da palavra para fazer um breve relato das dificuldades e persistência da mestranda, agradeceu à Comissão e passou a palavra para a Profa. Graça Cunha, Co-orientadora da aluna, que agradeceu à comissão e parabenizou a mestranda. Finalmente, a sessão foi suspensa para proceder o julgamento pela Banca Examinadora, a qual se reuniu na Secretaria do Curso, na presença do Coordenador. Após alguns comentários, a Comissão decidiu, por unanimidade, conceder a menção **"Aprovada com Distinção"**. Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros presentes. Recife, 30 de agosto de 2002.

Patrícia Maria Guedes Paiva
Patrícia Maria Guedes Paiva
Maria Inês Sucupira Maciel
Nicácio Henrique da Silva
Nicácio Henrique da Silva

José Miron de Oliveira
 **José Miron de Oliveira**
Secretário do Curso de
Mestrado em Bioquímica / CCB / UFPE

Aos meus pais, Othelino Filho e Yolete Maria
Aos meus irmãos, Othelino Neto e Flávia Maria
Ao meu marido, Washington Kleber
Aos meus filhos Ana Beatriz e Vítor Kleber

AGRADECIMENTOS

Em especial a Deus, como ser supremo, que me concedeu a perseverança e a fé, sentimentos que estiveram sempre presentes em todos os momentos.

À Professora Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva, pela extraordinária orientação científica, pelo incentivo à pesquisa, pela confiança, pela amizade afetuosa e exemplo de vida universitária.

À Professora Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha, pela co-orientação científica, confiança, apoio e amizade.

Ao Professor Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, pelo valioso material cedido, importante contribuição para esta dissertação.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPE, pela constante ajuda neste período.

Aos que fazem parte do Laboratório de Glicoproteínas da UFPE, pela calorosa receptividade.

À Adriana Argolo, Andréa Santos, Elba Verônica e Teodomiro Gomes Filho pelo conhecimento compartilhado durante esta caminhada.

À Maria Barbosa Reis pela atenção e amizade.

Aos amigos do curso de Mestrado, em especial a Ana Mary, Ana Cláudia e Valéria Claudiane pela força, companheirismo e amizade.

Aos meus pais, Othelino e Yolete por todo amor, carinho e dedicação, essenciais para realização deste e de todos os projetos de minha vida.

Aos meus irmãos Othelino Neto e Flávia Maria, por estarem sempre ao meu lado, torcendo e acreditando em mim.

A Washington Kleber, por sua inestimável paciência, apoio, estímulo e amor.

Aos meus filhos, Ana Beatriz e Vítor Kleber, frutos de minha vida e razão da minha existência.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Polietilenotereftalato (Dacron)	8
Figura 2: Imobilização covalente de proteínas ao Dacron	9
Figura 3: Aspectos do fruto (romã) de <i>Punica granatum</i>	11

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Purificação de lectinas vegetais utilizando sulfato de amônio	5
Tabela 2: Aplicação biotecnológica de lectinas imobilizadas	10

LISTA DE ABREVIATURAS

AH: Atividade hemaglutinante
AHE: Atividade hemaglutinante específica
BmoLL: Lectina de *Bauhinia monandra*
Con A: Lectina de *Canavalia ensiformis*
Cra: Lectina de *Cratylia mollis*
CTA: Lectina de *Clerodendro trichotomum*
E CorL: Lectina de *Erythrina corallodendron*
HPA: Lectina de *Helix pomatia*
ITCm: Inibidor de tripsina de *Cratylia mollis*
LBA: Lectina de *Phaseolus lunatus*
LDL: Lipoproteína de baixa densidade
LOLI: Lectina de *Lathyrus ochrus*
PgPeL: Lectina de *Punica granatum*
SDS: Sulfato sódico de dodecila
SNA: Lectina de *Sambucus nigra*
WFA: Lectina de *Wistaria floribunda*
WGA: Lectina de *Triticum vulgaris*

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IV
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
SUMÁRIO	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Lectinas	1
1.1.1. Aspectos Gerais	1
1.1.2. Purificação e caracterização	4
1.2. Imobilização de Proteínas	6
1.3. <i>Punica granatum</i> Linn.	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. Geral	13
2.2. Específicos	13
3. RELEVÂNCIA DO TRABALHO	14
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
5. ARTIGO “A lectin from pericarp of pomegranate (<i>Punica granatum</i>): purification, partial characterization and its application an affinity adsorbent to glycoproteins”.	23
6. CONCLUSÕES	30
7. ANEXO	31

RESUMO

A Natureza é uma fonte de substâncias bioativas e pericarpo de *Punica granatum* Linn. (romã) tem sido usado em medicina popular. Proteínas hemaglutinantes (lectinas) interagem seletivamente e reversivelmente com carboidratos e glicoconjugados. O objetivo deste trabalho foi o isolamento da lectina de pericarpo de *P. granatum* (PgPeL) e sua imobilização para produzir uma matriz de afinidade. Extrato de pericarpo de *Punica granatum* foi submetido a precipitação com sulfato de amônio e as frações obtidas foram avaliadas quanto a seus efeitos sobre aglutinação de eritrócitos (tipos humanos e de coelho). A fração sobrenadante 60% (SF60) mais ativa foi usada para avaliar a especificidade da lectina (carboidratos e glicoproteínas), a estabilidade térmica da proteína (30 a 100°C, 30 min ou 100°C, 60 min), o efeito de íons (Ca^{2+} e Mg^{2+}) e pH (valores de 6,5 a 8,0) sobre a atividade hemaglutinante. PgPeL obtida após cromatografia da SF60 em coluna de Sepharose CL-6B (purificação de 10 vezes) foi imobilizada em Dacron ferromagnetizado (FMD); PgPeL-FMD foi aplicada para o isolamento de fetuína e ovoalbumina. SF60 aglutinou todos os eritrócitos humanos (título de 512^{-1}) mas o melhor resultado foi obtido com células de coelho (título de 2048^{-1}). A atividade de PgPeL não foi estimulada por íons divalentes e foi inibida por frutose, manose, caseína, fetuína, ovoalbumina como também por tiroglobulina. A mais alta atividade lectínica (pH 7,5) foi totalmente perdida em pH 8,0. PgPeL foi ativa (título de 4^{-1}) após aquecimento a 100°C. PgPeL imobilizada (87%) foi capaz de ligar fetuína (160 µg), mas ovoalbumina não foi retida. PgPeL-FMD pode ser usada para purificação de glicoproteínas sendo um método simples e rápido.

ABSTRACT

Nature is a source of active substances and pericarp of *Punica granatum* Linn. (*romã*, pomegranate) has been used in popular medicine. Hemagglutinating proteins (lectins) interact selectively and reversibly with carbohydrates and glycoconjugates. The aim of this work was the isolation of *P. granatum* pericarp lectin (PgPeL) and its immobilization to produce an affinity matrix. Extract of pericarp was submitted to ammonium sulphate precipitation and the fractions obtained were evaluated with regard to its effects on erythrocyte agglutination (rabbit and human types). The most active 60% supernatant fraction (SF60) was used to evaluate lectin specificity (carbohydrates and glycoproteins), protein thermic stability (30 to 100°C, 30 min or 100°C, 60 min) and the effect of ions (Ca^{2+} and Mg^{2+}) or pH (6.5 to 8.0 values) on hemagglutinating activity. PgPeL obtained after chromatography of SF60 on Sepharose CL-6B column (purification of 10 folds) was immobilized on ferromagnetic Dacron (FMD); PgPeL-FMD was applied to fetuin and ovalbumin isolation. SF60 agglutinated all human erythrocytes (titer of 512^{-1}); but the best result was obtained with rabbit cells (titer of $2,048^{-1}$). PgPeL activity was not stimulated by divalent ions and was inhibited by fructose, mannose, casein, fetuin, ovalbumin, as well as thyroglobulin. The highest lectin activity (pH 7.5) was totally lost at pH 8.0. PgPeL was active (titer of 4^{-1}) after heating to 100°C. Immobilized PgPeL (87%) was able to bind fetuin (160 µg), but ovalbumin was not retained. PgPeL-FMD can be used to glycoprotein purification in a very fast and simple method.

1. INTRODUÇÃO

1.1. LECTINAS

1.1.1. Aspectos gerais

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, capazes de interagir de forma reversível com carboidratos através de pelo menos dois sítios de ligação, aglutinar células vegetais ou animais e precipitar polissacarídeos, glicoproteínas e glicolipídios (Goldstein *et al.*, 1980). A característica não imune das lectinas serve para distinguí-las de anticorpos anticarboidratos que aglutinam células. Adicionalmente, enquanto os anticorpos são estruturalmente similares, as lectinas diferem entre si quanto à composição em aminoácidos, massa molecular, estrutura tridimensional e necessidade de metais para a atividade (Kennedy *et al.*, 1995).

As lectinas não são apenas encontradas em animais, mas também em outros organismos como plantas (Ratanapo *et al.*, 2001) e microrganismos (Kawagishi *et al.*, 2001). Dentre as funções biológicas das lectinas das plantas, discute-se o seu papel na interação planta/bactéria (Ratanapo *et al.*, 2001) e no mecanismo de defesa da planta (Freire *et al.*, 2002).

A presença de lectinas numa amostra pode ser detectada a partir de ensaios nos quais estas interagem com as células, através dos seus sítios de ligação, resultando em aglutinação. O ensaio de hemaglutinação é o mais comumente utilizado pela simplicidade e facilidade de visualização do fenômeno. Os eritrócitos, origem humana ou outros animais, podem ser enzimaticamente (Sato *et al.*, 2000) ou quimicamente tratados (Coelho e Silva, 2000).

A confirmação de que a hemaglutinação é devida à presença da lectina na amostra se dá pela sua inibição com os carboidratos (Freire *et al.*, 2002) ou glicoproteínas (Coelho e Silva, 2000). A especificidade de uma lectina é dada pelo monossacarídeo que, em menor concentração, possua maior habilidade para inibir a sua atividade de hemaglutinação ou de precipitação de polissacarídeos e

glicoproteínas. Algumas lectinas apresentam interações mais fortes com oligossacarídeos em comparação com monossacarídeos e outras interagem quase exclusivamente com oligossacarídeos. Assim, as lectinas são classificadas como específicas, apresentando interação com um monossacarídeo, ou não-específicas, apresentando interação com oligossacarídeos (Sharon e Lis, 1990).

A estrutura tridimensional da Concanavalina A (Con A), lectina isolada de sementes de *Canavalia ensiformis*, foi descoberta em 1970, mas somente em 1999 foi elucidada a estrutura da lectina complexada com metil- α -manosídeo. Foram também definidas as estruturas dos complexos de *Lathyrus ochrus* (LOLI)-glicose ou LOLI-manose, lectina da *Erythrina corallodendron* (E CorL)-lactose e *Griffonia simplicifolia* (lectin IV)-tetrassacarídeo específico de tipos sanguíneos. Foi evidenciada uma importante propriedade das lectinas de leguminosas que é a habilidade de discriminação entre carboidratos muito similares tais como glicose e galactose (Sharon & Lis, 2001), que diferem na configuração de uma única hidroxila (4-OH) ou na posição de uma ligação glicosídica [NeuAc(α 2-3)Gal vs NeuAc(α 2-6)Gal].

Os sítios de ligação aos carboidratos são depressões rasas na superfície da proteína e em geral a interação entre a lectina e o carboidrato ocorre através de pontes de hidrogênio, com contribuição das forças de van der Waals e interações hidrofóbicas entre os resíduos de aminoácidos aromáticos. A especificidade do sítio de ligação não é determinada apenas pelos seus aminoácidos constituintes; a forma exata do sítio de ligação e a disposição espacial dos aminoácidos vizinhos contribuem para a especificidade (Sharon & Lis, 2001).

Algumas vezes as interações com carboidratos requerem Ca^{2+} e Mn^{2+} ou outro íon metal de transição, que estão localizados dentro do sítio de ligação ao carboidrato; os aminoácidos que coordenam o íon metal incluem ácido aspártico e asparagina. O íon metal serve para manter a integridade das subunidades da lectina e ajuda a posicionar o resíduo de aminoácido para a ligação com o carboidrato, mas não interage diretamente com o carboidrato (Sharon & Lis, 2001).

Um grande número de lectinas foi isolado de várias plantas e diferem em suas especificidades por carboidratos e características estruturais. Normalmente consistem em duas ou quatro subunidades de 25-30 kDa, cada uma com um sítio de ligação ao carboidrato. Pontes dissulfeto, pontes de hidrogênio e as interações hidrofóbicas podem estar envolvidas na associação das subunidades (Kennedy *et al.*, 1995).

As lectinas de plantas são classificadas em merolectinas, hololectinas e quimerolectinas (Peumans & van Damme, 1995). As merolectinas são proteínas formadas exclusivamente por um domínio de ligação ao carboidrato; são proteínas pequenas, formadas por um único polipeptídeo e, por conta da sua natureza monovalente, são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. As hololectinas contêm dois ou mais domínios de ligação a carboidrato que são idênticos ou muito semelhantes; este grupo compreende todas as lectinas que possuem múltiplos sítios de ligação, sendo capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. As quimerolectinas são proteínas que contêm um domínio de ligação ao carboidrato e um domínio não relacionado (tal domínio possui uma atividade catalítica bem definida ou não apresenta nenhuma atividade biológica) que atua de forma independente.

As lectinas de planta podem ainda ser classificadas, de acordo com sua especificidade de interação com os carboidratos; por exemplo, em lectinas glicose/manose (Correia & Coelho, 1995), galactose (Machuka *et al.*, 1999), ácido-siálico e manose específicas (Mo *et al.*, 1993; Koike *et al.*, 1995). Recentemente estudos cristalográficos da estrutura de lectinas associadas a açúcares complexos demonstraram que a posição dos sítios combinantes das lectinas são diferentes, embora possam pertencer à mesma família. Assim, lectinas com a mesma especificidade de ligação ao açúcar apresentam diferenças em suas interações com as membranas das células e glicoconjugados. A diferença de interação resulta em efeitos distintos na estimulação mitogênica, na produção de γ -interferon pelos linfócitos humanos, na estimulação de macrófagos, nos efeitos edematogênicos e na liberação de histamina.

As lectinas de plantas são utilizadas em estudos bioquímicos. Em culturas

de células, observou-se que a lectina do alho (*Allium sativum* L.) apresentou um efeito citotóxico em células de linfoma humano, mas não em leucócitos humanos normais (Karasaki *et al.*, 2001). Por outro lado, algumas estimulam a proliferação de linfócitos e são utilizadas como reagentes em estudos de mitogenicidade (Barbosa *et al.*, 2001).

A afinidade das lectinas por glicoproteínas de superfície celular tem sido usada para a caracterização epidemiológica da *Neisseria gonorrhoeae* e diferenciação de outras espécies de *Neisseria* (Wu *et al.*, 2001) ou para identificação de grupos sanguíneos ABO (Matsui *et al.*, 2001).

1.1.2. Purificação e caracterização

Apesar das sementes serem a principal fonte de lectinas de plantas, muitas têm sido isoladas de tecidos vegetativos (Wititsuwannakul *et al.*, 1998; Coelho & Silva, 2000). A lectina isolada do pericarpo dos frutos de *Solanum tuberosum* é específica para N-acetilglicosamina e semelhante àquela obtida da tubera da mesma planta (Kilpatrick, 1980a).

No isolamento de lectinas são decisivas as características estruturais das proteínas; fatores como carga elétrica, tamanho e solubilidade são avaliados para definição do procedimento de purificação. Para a preparação do extrato bruto seleciona-se a solução de extração, a temperatura e o tempo de duração do processo. Em geral as lectinas são solúveis em NaCl 0,15 M (Anuradha & Bhide, 1999) no entanto, algumas vezes a utilização de soluções-tampão como extrator é necessária para a manutenção da atividade biológica (Machuka *et al.*, 1999). No extrato avalia-se então a concentração protéica e a presença da atividade hemaglutinante (AH); a AH específica (AHE) é determinada dividindo-se a AH pela concentração de proteína (mg/ml).

As proteínas do extrato podem então ser fracionadas com sulfato de amônio, sendo o esquema de saturação do sal escolhido, aquele que resultar em frações enriquecidas da lectina (Tabela 1).

Tabela 1. Purificação de lectinas vegetais utilizando sulfato de amônio

Origem	Espécie	Lectina	Sulfato de amônio	Referência
Entrecasca	<i>Sophora japonica</i>	----	0-70%	Ueno & Lim, 1991
Exudato	<i>Lycopersicon esculentum</i>	----	0-50%	Kilpatrick, 1980b
Folha	<i>Bauhinia monandra</i>	BmoLL	0-60%	Coelho & Silva, 2000
Fruto	<i>Clerodendro trichotomum</i>	CTA	30-90%	Kitagaki <i>et al.</i> , 1985
Semente	<i>Cratylia mollis</i>	Isoforma 1	40-60%	Correia & Coelho, 1995
		Isoforma 2	60-80%	Paiva & Coelho, 1992
		Isoforma 3	0-40%	Paiva & Coelho, 1992

Similar ao isolamento de outras proteínas, os métodos cromatográficos são úteis na obtenção de lectinas. Dentre estes, a cromatografia de afinidade tem sido o mais amplamente utilizado devido resultar, algumas vezes, em preparações protéicas homogêneas (Coelho & Silva, 2000). Matrizes polissacarídicas tais como Sephadex (L'Hocine *et al.*, 2000), Quitina (Freire *et al.*, 2002) e Sepharose (Machuka *et al.*, 1999) constituídos de unidades de glicose, N-acetil glicosamina e galactose, respectivamente são selecionados de acordo com a especificidade da lectina a ser isolada.

Alternativamente ou adicionalmente à cromatografia de afinidade, a cromatografia de troca iônica e a de exclusão molecular são empregadas (Tabuchi *et al.*, 2001). No primeiro tipo, a utilização de uma matriz catiônica (Dietilaminoetil-Celulose) ou aniônica (Carboximetil-Celulose) dependerá do ponto isoelétrico da proteína a ser purificada e portanto da carga líquida que ela terá no pH selecionado para a realização do processo (Chung *et al.*, 2001). A cromatografia de exclusão molecular (gel filtração) tem como princípio de separação a diferença de massa molecular; moléculas pequenas ao penetrarem nos poros do gel têm a sua velocidade de exclusão diminuída. Matrizes como Sephadex (Anuradha *et al.*, 1999) e Sepharose (Anuradha *et al.*, 1999) são utilizadas. O tamanho da proteína purificada pode também ser determinado na cromatografia, desde que proteínas de massa molecular conhecida sejam utilizadas como padrões (kawagishi *et al.*, 2001).

A caracterização estrutural de lectinas também pode ser obtida através de eletroforese em gel de poliacrilamida. A determinação da massa molecular de

subunidades constituintes se dá pela incorporação de sulfato sódico de dodecila (SDS) e de agente redutor (β -mercaptoetanol) no ensaio (kawagishi *et al.*, 2001). Na ausência destes reagentes e com técnicas específicas, a eletroforese pode indicar a natureza acídica (Coelho & Silva, 2000) ou básica (Audy *et al.*, 1990) da lectina isolada.

A avaliação da atividade biológica em função do pH, da temperatura (Machuka *et al.*, 1999) e da presença de íons, além de contribuir para a caracterização da proteína, define as condições a serem utilizadas na aplicação biotecnológica da lectina e na avaliação dos seus efeitos fisiológicos.

1.2. IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS

Na década de 80, sistemas biológicos ou suas partes foram usados para formar ou modificar produtos, ou ainda desenvolver outros sistemas biológicos com propósitos específicos. O conjunto desses esforços foi designado como Biotecnologia, que em sua definição clássica inclui: “a aplicação de princípios científicos para usos clínicos ou industriais de sistemas biológicos a fim de produzir bens e serviços” (Green, 1991).

Bull (1987) resumiu a dificuldade em caracterizar a Biotecnologia como “um conjunto complexo de tecnologias, capazes de gerar um novo ímpeto na concepção, orientação e estratégia das indústrias tradicionais”. Desta maneira, a biotecnologia pode ser entendida como um esforço para relacionar os avanços tecnológicos inovadores da ciência, nos campos da física, eletrônica e biologia molecular e seus objetivos aplicados, levando-se em consideração aspectos econômicos. Tais tecnologias incluem manipulação celular e molecular, técnicas microbianas para crescimento e fermentação, além de produção, caracterização e modificação de enzimas e outras proteínas (Green, 1991).

As proteínas têm sido imobilizadas em estruturas poliméricas, insolúveis em meio aquoso, de maneira que conjugados biologicamente ativos são obtidos (Carneiro-da-Cunha *et al.*, 1999, 2002; Rocha 2002); o método visa o aumento da estabilidade da molécula protéica e a reutilização do produto obtido (Chaga,

2001). Trevan (1980) definiu a imobilização de enzimas como um processo de “separação física entre o catalisador e o seu meio de reação, de forma que as moléculas do substrato e do produto possam difundir-se facilmente entre as duas fases”. Além disso, a recuperação do catalisador, com a finalidade de reutilização, será viável e o seu uso contínuo em reatores tornará o processo ainda mais atrativo do ponto de vista econômico.

Entre as metodologias utilizadas para a imobilização de biomoléculas, destacam-se:

a) *Adsorção*, podendo ser definida como um processo de imobilização em que a proteína adere à superfície do suporte, por meio de interações hidrofóbicas, eletrostáticas e pontes de hidrogênio (Rosevear *et al.*, 1987). Os plásticos são amplamente utilizados como matrizes; trata-se de uma metodologia simples, de fácil execução, mas que encerra uma grande desvantagem: desadsorção das proteínas fixadas causada pela variação de pH, força iônica e temperatura (Kemeny & Challacombe, 1988).

b) *Enclausuramento*, consistindo na inclusão da proteína a ser imobilizada no interior de polímeros, de forma a impedir a difusão do elemento fixado, permitindo, no entanto, uma livre difusão de outras moléculas. As matrizes mais utilizadas nesta metodologia são os géis de poliacrilamida, alginato, gelatina, agar e agarose (Coughlan *et al.*, 1988).

c) *Ligação covalente*, onde a proteína se liga a um suporte sólido através da ligação covalente envolvendo diretamente os resíduos de aminoácidos e os grupos reativos da superfície do suporte ou, através do uso de reagentes bi ou multifuncionais. Entre os grupos funcionais de resíduos de aminoácidos que podem participar da reação encontram-se: grupos carboxílicos dos ácidos aspártico e glutâmico; grupos amino da lisina e da hidroxilisina; grupamento amino e carboxílicos terminais das proteínas; fenólicos da tirosina; imidazol da histidina; indol do triptofano; sulfidril da cisteína; dissulfeto da cistina; hidroxila da serina, da hidroxiprolina, da hidroxilisina e do ácido hidroxiglutâmico; guanidina da arginina; mercaptometil da metionina; fenil da tirosina e fenilalanina; amida da asparagina e glutamina (Torchilin, 1991). Como a maioria dos suportes utilizados

para a ligação covalente não apresentam grupos reativos que se liguem diretamente à proteína, torna-se necessário o uso de métodos de ativação que podem ser reações de diazotação, formação de derivados azida, alquilação, de amidação e utilização de reagentes de condensação, entre outros. O maior atrativo deste método é a alta estabilidade operacional dos derivados obtidos, devido à força da ligação covalente entre proteína e suporte de baixa massa molecular, capazes de formar ligações cruzadas com as moléculas protéicas (Kennedy & White, 1985).

O polietilenotereftalato, mais conhecido como Dacron (Figura 1), é um poliéster de estrutura linear, insolúvel em meio aquoso, produzido pela condensação entre o ácido tereftálico e o etileno glicol. O Dacron é comercialmente disponível em uma grande variedade de formas físicas tais como membranas, pó, tubos, etc. Atualmente, ele vem sendo empregado, na forma de filme, na embalagem de diferentes produtos comerciais em face de seu baixo custo. Esta vantagem econômica aliada à versatilidade das possíveis apresentações, são recomendações favoráveis ao seu uso como suporte para a síntese de conjugados biológicos ativos, insolúveis em água.

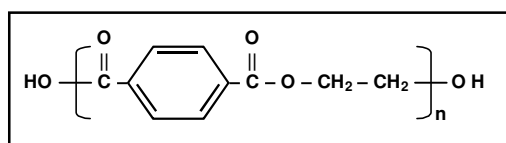


Figura 1. Polietilenotereftalato (Dacron).

n pode assumir valores de até 15.000 unidades.

O Dacron foi proposto inicialmente como suporte para fixação covalente de proteínas por Weetal (1970) e a metodologia descrita baseava-se na introdução de grupos funcionais segundo quatro etapas: silanização do dacron com aminopropiltriétoxissilano; conversão do dacron-alquilaminossilano a um derivado arilamina, usando ácido nitrobenzoilclorídrico; conversão do derivado arilamina a arilazida, usando nitrito de sódio e fixação da proteína.

Em 1984, Melo propôs uma metodologia em três etapas para fixar covalentemente proteínas ao Dacron que consistia em hidrazinólise parcial de filmes de dacron; conversão de grupos hidrazida à azida através do uso de nitrito

de sódio e imobilização de proteína ao suporte.

Devido à difícil recuperação do Dacron na forma de pó, obtido por esta metodologia, Carneiro Leão *et al.* (1991) propuseram o uso do Dacron em pó na forma magnetizada como suporte para a imobilização de proteínas. O uso de suportes magnetizados para a imobilização de proteínas foi proposto visando simplificar a utilização da matriz obtida. Estas apresentam boas propriedades mecânicas além de serem resistentes à grande parte dos solventes e ao ataque microbiano. Devido a sua grande funcionalidade a automatização dos processos é perfeitamente viável, o que torna a sua utilização economicamente interessante. A matriz amiloglicosidase-Dacron magnetizado obtida apresentou atividade catalítica e foi recuperada do meio de incubação por campo magnético.

Pinheiro *et al.* (1999) imobilizaram com êxito albumina ao Dacron na forma hidrazida, utilizando o glutaraldeído como agente de condensação (Figura 2).

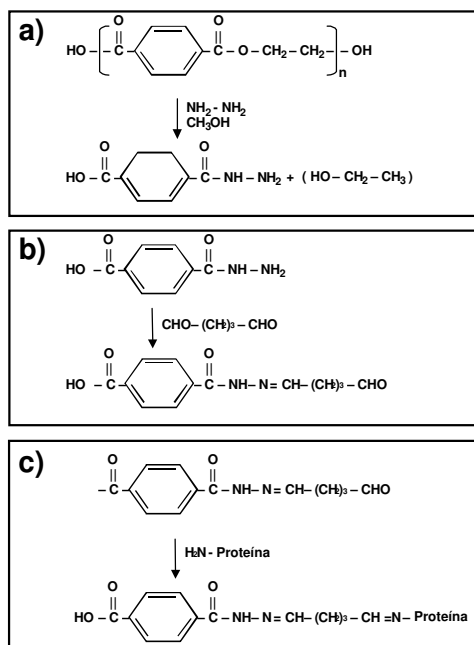


Figura 2. Imobilização covalente de proteínas ao Dacron.

a) Hidrazinólise; b) Ativação com glutaraldeído; c) Ligação covalente com a proteína.

A cromatografia de afinidade metal-imobilizado representa uma técnica de separação relativamente nova para a purificação de proteínas. Rocha (2002) purificou a tripsina de intestino de tilapia nilótica, utilizando o inibidor de tripsina de *Cratylia mollis* (ITCm) imobilizado covalentemente em partículas paramagnéticas.

A potencialidade biotecnológica de lectinas estimula a busca por suportes para imobilização destas proteínas. Os suportes contendo lectinas podem ser utilizadas para o isolamento de carboidratos e glicoproteínas de interesse biotecnológico, para detecção de diferente padrão de glicosilação de proteínas em estados patológicos, assim como, para o estudo estrutural de glicoconjugados (Tabela 2).

Tabela 2. Aplicação biotecnológica de lectinas imobilizadas

Lectina	Utilização	Referência
Cra-Sepharose	Isolamento de glicoproteínas plasmáticas humanas	Lima <i>et al.</i> , 1997
Con A-Sepharose	Isolamento de isoformas da α -fetoproteína de soro de pacientes com câncer	Chan & Miao, 1986
	Purificação de glicoproteína do vírus da imunodeficiência de macacos	Gilljam <i>et al.</i> , 1994
	Análise estrutural de N-glicanos de soja	Kimura & Kitahara, 2000
	Deteção de alteração em cadeias glicídicas N-ligadas no antígeno próstata-específico em carcinoma de próstata	Sumi <i>et al.</i> , 1999
	Isolamento da gamaglutamil transferase de plaquetas humanas	Sener & Yardimci, 2000
	Isolamento de invertase de <i>Aspergillus niger</i> e xiloglicano transferase de planta	L'Hocine <i>et al.</i> , 2000; Tabuchi <i>et al.</i> , 2001
HPA, UEA-1, LBA, WFA-Agarose	Estudo comparativo da avaliação da ligação de lectinas a oligossacarídeos	Matsui <i>et al.</i> , 2001
Jacalina-Sepharose	Isolamento de IgA secretória humana	Kondoh <i>et al.</i> , 1987
SNA-Sepharose	Fracionamento de oligossacarídeos, glicopeptídeos e glicoproteínas	Shibuya <i>et al.</i> , 1987
WGA-Sepharose	Isolamento de receptor para fosfolipase A2	Copic <i>et al.</i> , 1999
	Isolamento de proteases	Jiménez <i>et al.</i> , 2000

Cra, *Cratylia mollis*; HPA, *Helix pomatia*; LBA, *Phaseolus lunatus*; SNA, *Sambucus nigra*; WFA, *Wistaria floribunda*; WGA, *Triticum vulgaris*.

1.3. *Punica granatum* Linn.

Punica granatum, planta da família Punicaceae é uma espécie oriunda da África e Ásia Ocidental, aclimatada na Bahia (Machado *et al.*, 2000). A romanzeira é um arbusto frutífero, ereto e seus ramos espinhosos revestem-se, quando jovens, de cascas avermelhadas. Apresenta folhas glabras, opostas, um tanto onduladas e inteiras, de formato lanceolado. Nas extremidades dos ramos, surgem grandes flores solitárias. É uma árvore com significativa importância econômica na indústria e na medicina. A indústria química utiliza as cascas do tronco da romanzeira na fabricação de tintas, assim como as cascas dos frutos, que servem para preparar adubos e tinturas (Alzugaray & Alzugaray, 1988). As flores são usadas para o tratamento de *diabetes mellitus* na Índia; a administração oral do extrato hidro-etanólico (50% v/v) reduziu significativamente a taxa de glicose sangüínea em ratos com diabetes induzida por aloxano (Jafri *et al.*, 2000).

Os frutos (romã) constituem-se em bagas de casca dura e amarela com manchas verdes; internamente as romãs contêm inúmeras sementes carnosas, de cor vermelha e sabor agridoce (Figura 3).

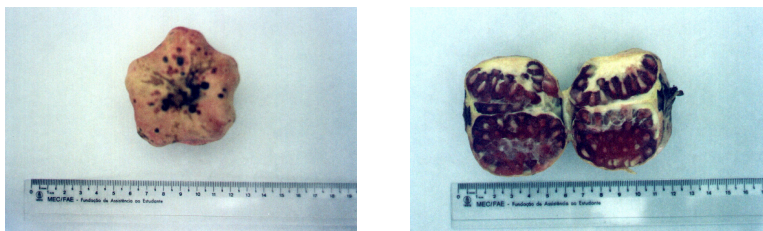


Figura 3. Aspectos do fruto (romã) de *Punica granatum*

Os extratos etanólicos dos frutos foram avaliados quanto a atividade antimicrobiana sendo eficientes frente ao *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (Machado *et al.*, 2000).

As sementes contêm o princípio hipoglicemiante; o extrato metanólico reduziu significativamente os níveis de glicose sangüínea em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (Das *et al.*, 2001).

O extrato aquoso da casca da romã quando testado em ratos com lesões

gástricas induzidas, diminuiu significativamente o conteúdo ácido estomacal, sugerindo um efeito gastro-protetor (Gharzouli *et al.*,1999).

Gracious *et al.* (2001) estudaram a atividade imunomodulatória da romã; a casca pulverizada da fruta apresentou um efeito estimulatório dos componentes do sistema imune em coelhos.

Os extratos aquosos e metanólicos das cascas, das sementes e dos frutos apresentaram atividade antioxidante em modelos *in vitro*; os extratos foram avaliados quanto aos seus efeitos na peroxidação lipídica e na oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) humana (Shing *et al.* , 2002).

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Isolar e caracterizar parcialmente a lectina do pericarpo de *Punica granatum*; obter o suporte lectina-Dacron magnetizado.

2.2. ESPECÍFICOS

- Isolar a lectina (PgPeL) através de fracionamento com sulfato de amônio e métodos cromatográficos;
- Identificar o padrão de aglutinação com diferentes eritrócitos;
- Determinar a especificidade monossacarídica;
- Determinar a estabilidade térmica da lectina;
- Avaliar o efeito dos íons magnésio (Mg^{2+}) e cálcio (Ca^{2+}) na atividade hemaglutinante;
- Determinar a influência do pH na atividade hemaglutinante;
- Identificar o padrão da proteína em eletroforese para proteínas nativas, bem como em condições desnaturantes e redutoras;
- Imobilizar a lectina em Dacron magnetizado (PgPeL-Dacron);
- Avaliar a matriz PgPeL-Dacron quanto à ligação de glicoproteínas.

3. RELEVÂNCIA DO TRABALHO

O Laboratório de Glicoproteínas do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco tem como propósito, desde 1983, a obtenção de um painel de lectinas e das suas formas moleculares múltiplas. As propriedades bioativas detectadas na casca da romã justificam uma avaliação dos seus componentes protéicos. O isolamento da lectina do pericarpo de romã além de contribuir para a caracterização estrutural de proteínas presentes nesta parte do fruto, abre perspectivas para a avaliação posterior da proteína quanto as suas propriedades bioativas e, imobilizada em dacron magnetizado, como matriz para o isolamento de glicoproteínas.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZUGARAY, D.; ALZUGARAY, C. **Plantas que curam**. 1988. Três Livros e Fascículos Editora, São Paulo – SP.

ANURADHA, P.; BHIDE, S. V. Na isolation complex from *Trichosanthes anguina* seeds. **Phytochemistry**, v. 52, p. 751- 758, 1999.

AUDY, P.; LE QUÉRÉ, D.; LECLERC, D.; ASSELIN, A. Eletrophoretic forms of lysozyme activity in various plant species. **Phytochemistry**, v. 29, p. 1143 – 1159, 1990.

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.; GRANGEIRO, T. B.; DE FREITAS, L. A. R.; BARRAL-NETO, M. *In vivo* lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 637 – 638, 2001.

BULL, A. T. The biotechnologies of the nineties. In: NEIJSEL, O. M.; VAN DER MEER, R. R.; LUYBEN, K. A. M. (eds.) **Proceedings on the 4th European Congress on Biotechnology**. Amsterdam: Elsevier Science Publications, 1987, v. 4, p.189 – 201.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; ROCHA, J. M. S.; GARCIA, F. A. P.; GIL, M. H. Lipase immobilisation on to polymeric membranes. **Biotechnology Techniques**, v. 13, p. 403 – 409, 1999.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; ROCHA, J. M. S.; CABRAL, J. M. S.; GIL, M. H.; GARCIA, F. A. P. Covalent immobilization of lipase on different supports. **Latin American Applied Research**, v. 32, p. 69 – 72, 2002.

CARNEIRO LEÃO, A. M. A.; OLIVEIRA, E. A.; CARVALHO Jr, L. B. Immobilization of protein on Ferromagnetic Dacron. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 31, p. 53 – 58, 1991.

CHAN, D. W.; MIAO, Y. C. Affinity chromatographic separation of alpha-fetoprotein variants: development of a mini-column procedure, and application to cancer patients. **Clinical Chemistry**, v. 32, p. 2143 – 2146, 1986.

CHUNG, J. J.; RATNAPALA, L. A.; COOKE, I. M.; YANAGIHARA, A. A. Partial purification and characterization of a hemolysin (CAH1) from Hawaiian box jellyfish (*Carybdea alata*) venom. **Toxicon**, v. 39, p. 981 – 990, 2001.

CHAGA, G. S. Twenty-five of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. **Journal of Biochemistry and Biophysical Methods**, v. 49, p. 313 – 334, 2001.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 295- 300, 2000.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, Isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (amaruto bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, p. 261 – 273, 1995.

COPIC, A.; VUCEMILO, N.; GUBENSEK, F.; KRIZAJ, I. Identification and purification of a novel receptor for secretory phospholipase A(2) in porcine cerebral cortex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 26315 – 26320, 1999.

COUGHLAN, M. P.; KIERSTAN, M. P.; BORDER, P. M.; TURNER, A. P. F. Analytical applications of immobilized proteins and cells. **Journal of Microbiological Methods**, v. 8, p. 1 – 50, 1988.

DAS, A. K.; MANDAL, S. C.; BANERJEE, S. K.; SINHA, S.; SAHA, B. P.; PAL, M. Studies on the hypoglycaemic activity of *Punica granatum* seed in streptozotocin induced diabetic rats. **Phytoterapy Research**, v. 15, n. 7, p. 628 – 629, 2001.

FREIRE, M. G. M.; GOMES, V. M.; CORSINI, R. E.; MACHADO, O. L. T.; DE SIMONE, S. G.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Italisia esculenta* seeds that

interferes with fungal growth. **Plant Physiological Biochemistry**, v. 40, p. 61 – 68, 2002.

GHARZOULI, K.; KHENNOUF, S.; AMIRA, S.; GHARZOULI, A. Effects of aqueous extracts from *Quercus ilex* L. root bark, *Punica granatum* L. fruit peel and *Artemisia herba-alba* Asso leaves on ethanol-induced gastric damage in rats. **Phytoterapy Research**, v. 13, p. 42 – 45, 1999.

GILLJAM, G.; SIRIDEWA, K.; HAMMAR, L. Purification of simian immunodeficiency virus SIV_{MAC}251, and of its envelope glycoprotein, gp148. **Journal of Chromatography A**, 675, p. 89 – 100, 1994.

GOLDSTEIN, I. J.; HUGHES, R. C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called lectin? **Nature**, v. 285, p. 66, 1980.

GRACIOUS, R. R.; SELVASUBRAMANIAN, S.; JAYASUNDER, S. Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits – a preliminary study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 85 – 87, 2001.

GREEN, C. C. Manufacturing and biotechnology synergism for the early 2.000's. In: KAMELY, D.; CHAKRABARTY, A. M.; KORNGUTH, S. E. (eds.) **Biotechnology: Bridging research and Applications**, Boston: Kluwer Academic Publishers, 1991, p. 15 – 42.

JAFRI M. A.; ASLAM, M.; JAVED, K.; SINGH, S. Effect of *Punica granatum* Linn. (flowers) on glucose level in normal and aloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, p. 308 – 314, 2000.

JIMENEZ DIAZ, M.; GIUNTA, S.; VALZ-GIANINET, J.; PEREYRA-ALFONSO, S.; FLORES, V.; MICELI, D. Porteases with plasminogen activator activity in hamster oviduct. **Molecular Reproduction Development**, v. 55, p. 47 – 54, 2000.

KARASAKI, Y.; TSUKAMOTO, S.; MIZUSAKI, K.; SUGIURA, T.; GOTOH, S. A garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumor cells. **Food Research International**, v. 34, p. 7 – 13, 2001.

KAWAGISHI, H.; TAKAGI, J.; TAIRA, T.; MURATA, T.; USUI, T. Purification and characterization of a novel lectin from the mushroom *Mycoleptonoides aitchisonii*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 53 – 58, 2001.

KEMENY, D. M; CHALLACOMBE, S. J. Microtitre plates and other solid phase supports. **ELISA and other Solid Phase Immunoassays**, New York: John Wiley & Sons Ltd., 1988, p. 31 – 35.

KENNEDY, J. F.; WHITE, C. A. Principles of immobilization of enzymes. In: WISEMAN, A. **Handbook of Enzyme Biotechnology**, 2 ed., New York: Alan Wiseman, 1985, p. 147 – 201.

KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219 – 230, 1995.

KIMURA, Y.; KITAHARA, E. Structural analysis of free n-glycans occurring in soybean seedlings and dry seeds. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, p. 1847, 1855, 2000.

KILPATRICK, D. C. Isolation of a lectin from the pericarp of potato (*Solanum tuberosum*) fruits. **The Biochemical Journal**, v. 191, p. 273 – 275, 1980a.

KILPATRICK, D. C. Purification and some properties of a lectin from the fruit juice of the tomato (*Lycopersicon esculentum*). **The Biochemical Journal**, v. 185, p. 269 – 272, 1980b.

KITAGAKI, H.; SENO, N.; YAMAGUCHI, H. Isolation and characterization of a lectin from the fruit of *Clerodendron trichotomum*. **Journal of Biochemistry**, v. 97, p. 791 – 799, 1985.

KOIKE, T.; BEPPU, H.; KUZUYA, H.; MARUTA, K.; SHIMPO, K.; SUZUKI, M; TITANI, K.; FUJITA, K. A 35 kDa manose – binding lectin with hemagglutinating and mitogenic activities from “Kidachi Aloe” (*Aloe arborescens* Milles var. *natalensis* Berger). **The Journal of Biochemistry**, v. 118, p. 1205 – 1210, 1995.

KONDOH, H. KABAYASH, K.; HAGIWARA, K. A simple procedure for isolation of human secretory IgA of IgA1 and IgA2 subclass by a jackfruit lectin, jacalin, affinity chromatography. **Molecular Immunology**, v. 24, p. 1219 – 1222, 1987.

L'HOCINE, L.; WANG, Z.; JIANG, B.; XU, S. Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger*. **Journal of Biotechnology**, v. 81, p. 73 – 84, 2000.

LIMA, V. L. M.; COELHO, M.T. S.; CICHINEL, Y. M. N.; SAMPAIO, C. . M.; OWEN, J. S.; COELHO, L. C. B. B. Immobilization *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, p. 27 – 32, 1997.

MACHUKA, J. S.; OKEOLA, O. G.; ELS, J. M. V. D.; CHRISPEELS, M. J.; LEUVEN, F. V.; PEUMANS, W. J. Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* harms. **Phytochemistry**, v. 52, p. 721 – 728, 1999.

MACHADO, T. B.; AMARAL, A. C. F.; LEAL, L. C. R.; PINTO, A. V.; SANTOS, K. R. N.; KUSTER, R. M. Análise da atividade antimicrobiana das espécies *Punica granatum* E *Tabebuia avallanadae* frente ao clone de *Staphylococcus aureus* resistente a Meticiclina prevalente no Brasil. **XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil (Livro de Resumos)**, p. 138, QU 052, Recife – PE, Outubro 2000.

MATSUI, T.; HAMAKO, J.; OZEKI, Y.; TITANI, K. Comparative study of blood group-recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligosaccharides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1525, p. 50 – 57, 2001.

MELO, E. H. M. **Imobilização covalente de enzimas em polietilenotereftalato sob a forma azida**. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1984.

MO, H.; VAN DAMME, E. J.; PEUMANS, W. J.; GOLDSTEIN, I. J. Purification and characterization of a mannose-specific lectin from shallot (*Allium ascalonicum*) bulbs. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.306, n. 2, p. 431 – 438, 1993.

PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 26, p. 113 – 118, 1992.

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

PINHEIRO, S. M. P.; CARVALHO Jr., L. B.; CHAVES, M. E. C. The use of ferromagnetic dextran as solid-phase in chemiluminescent assays. **Biotechnology Techniques**, v. 13, p. 919 – 922, 1999.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHALAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori*. **Plant Science**, v. 160, p. 739 – 744, 2001.

ROCHA, M. E. B. **Imobilização do inibidor de tripsina de *Cratylia mollis* em partículas paramagnéticas visando a purificação de tripsina de tilápia.** Dissertação (Mestrado) – Mestrado em Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

ROSEVEAR, A.; KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. **Immobilised Enzymes and Cells**. 1987. Adan Hilger Published, England.

SATO, Y.; MURAKAMI, M.; MIYAZAWA, K; HORI, K. Purification and characterization of a novel lectin from a freshwater cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 125, p. 169 – 177, 2000.

SENER, A.; YARDIMCI, T. Lectin affinity chromatography and electrophoretic properties of human platelet gamma-glutamyl transferase. **Platelets**, v. 11, p. 325 –

330, 2000.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins – a large family of homologous proteins, **FASEB Journal**, v. 4, p. 3198 – 3208, 1990.

SHARON, N.; LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. **The Molecular Immunology of Complex Carbohydrate**, p. 1 – 16, 2001

SHIBUYA, N.; GOLDSTEIN, I. J.; BROEKAERT, W. F.; NSIMBA-LUBAKI, M.; PEETERS, B.; PEUMANS, W. J. Fractionation of sialylated oligosaccharides, glycopeptides, and glycoproteins on immobilized elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 254, p. 1 – 8, 1987.

SINGH, R. P.; CHIDAMBARA MURTHY, K. N.; JAYAPRAKASHA G. K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*). **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, p. 81 – 96, 2002.

SUMI, S.; ARAI, K.; KITAHARA, S.; YOSHIDA, K. Serial lectin affinity chromatography demonstrates altered asparagines-linked sugar-chain structure of prostate-specific antigen in human prostate carcinoma. **Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications**, v. 727, p. 9 – 14, 1999.

TABUCHI, A.; MORI, H.; KAMISAKA, S.; HOSON, T. A new type of endo-xyloglucan transferase devoted to xyloglucan hydrolysis in the cell wall of azzuki bean epicotyls. **Plant Cell Physiology**, v.42, p. 154 – 161, 2001.

TORCHILIN, V. P. **Immobilized enzymes in medicine**. Berlin: Springer. Verlag. 1991. p. 134.

TREVAN, M. O. **Immobilized enzymes: an introduction and applications in biotechnology**. New York: John Wiley & Sons, 1980.

UENO, K.; LIM, D. J. Heterogeneity of glycoconjugates in the secretory cells of the chichilla middle ear and eustachian tubal epithelia: a lectin-gold cytochemical study.

Journal of Histochemical and Cytochemical, v. 39, p. 71 – 80, 1991.

WEETAL, H. H. Insolubilized L-asparaginase implant: a preliminary report. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 4, p. 597 – 599, 1970.

WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D.; SAKULBORIRUG, C. A lectin from bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Phytochemistry**, v. 47, p. 183 – 187, 1998.

WU, A. M.; WU, J. H.; TSAI, M. S.; HERP, A. Carbohydrate specificity of an agglutinin isolated from the root of *Trichosanthes kirilowii*. **Life Science**, v.66, p. 2571 – 2581, 2001.

5. ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO BIOTECHNOLOGY LETTERS

A lectin from pericarp of pomegranate (*Punica granatum*): purification, partial characterization and its application an affinity adsorbent to glycoproteins

Alves, C. Z. G. P.; Carneiro-da-Cunha, M. G.; Carvalho-Junior, L. B. C.; Coelho, L. C. B. B. & Paiva, P. M. G.

A lectin from pericarp of pomegranate (*Punica granatum*): purification, partial characterization and its application as an affinity adsorbent to glycoproteins

Alves, C. Z. G. P.¹; Carvalho-Junior, L. B. C.^{1,2}; Carneiro-da-Cunha, M. G.^{1,2}; Coelho, L. C. B. B.¹ & Paiva, P. M. G.^{1*}

¹*Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco, Av. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, Recife-PE, 50670-420, Brazil*

²*Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA/UFPE, Recife, PE, Brazil*

**Author for correspondence (Fax: +558132718354; E-mail: pmgpaiva@bol.com.br)*

Key words: Dacron, glycoprotein, lectin, pericarp, *Punica granatum*.

Abstract

A thermostable lectin was purified (10 folds) from pomegranate pericarp; the glycoprotein was active after immobilization on ferromagnetic Dacron. The obtained affinity matrix was able to bind fetuin.

Introduction

Lectins, hemagglutinating proteins that interact reversibly with carbohydrates, have been widely isolated from vegetable tissues, however not much is known about pericarp lectins. A thermostable glycoprotein, the lectin obtained from *Solanum tuberosum* pericarp (Kilpatrick, 1980), presented a polypeptide band of 80 kDa and

did not contain disulfide bonds. Immobilized lectins constitute tools for glycoconjugate isolations and it has been of great interest to search supports to immobilize these proteins; ferromagnetic Dacron (FMD) is advantageous since it allows the use of a magnetic field to separate adsorbed and soluble materials with reduction of operation time (Pinheiro *et al.*, 1999). Pericarp of pomegranate, *Punica granatum* L. (Punicaceae family), has been used to throat affections in Brazilian popular medicine. This paper describes the isolation and partial characterization of a *P. granatum* pericarp lectin (PgPeL). The protein was also immobilized on FMD, and the affinity matrix successfully bound fetuin.

Material and methods

Isolation of lectin

Proteins extracted from dried pericarp flour (10 g) with 0.15 M NaCl (100 ml) were fractionated with ammonium sulphate. The 60% supernatant fraction (SF60) was chromatographed on a Sepharose CL-6B (Sigma, St. Louis) column. Sample (8 mg of protein) was loaded onto a column (4.3 x 0.8 cm) previously equilibrated (15 ml/h flow rate) with 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.5. The active fractions were pooled and corresponded to purified lectin (PgPeL).

Hemagglutinating activity (HA)

Lectin activities were evaluated according to Paiva & Coelho (1992) by serial dilution in microtitulation plates and using glutaraldehyde treated rabbit or human erythrocytes. Titer was defined as the reciprocal of the highest dilution giving positive hemagglutination. The effects of pH, temperature and ion on HA, under 10 mM Tris-HCl buffer (6.5 to 8.0), heating (100 °C, 60 min) and Ca^{2+} or Mg^{2+} were

evaluated, respectively. The inhibition of HA used 200 mM carbohydrate or 0.5 mg/ml glycoprotein solutions.

Polyacrylamide gel electrophoresis

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) for acidic protein (Davis, 1964) and under denaturing and reducing conditions (Laemmli, 1970) used 7.5% and 12% Polyacrylamide gel, respectively. Glycoprotein nature was evaluated on SDS-PAGE by Schiff's reagent.

PgPeL-FMD preparation and evaluation of glycoprotein binding

PgPeL (234 µg) was immobilized on FMD (20 mg of powder) according to Pinheiro *et al.* (1999). PgPeL-FMD was washed with 0.1 M Tris HCl buffer, pH 7.5 and incubated (60 min, 25 °C) with 1.5 mg of fetuin or ovalbumin. Following, the particles collected using a magnetic field were washed with 1.0 M NaCl.

Results and discussion

A lectin was purified from pericarp of pomegranate, a fruit appreciated around the world. SF60 agglutinated all human types (titer of 512^{-1}) and was mainly active for rabbit erythrocytes (Table 1). Chromatography of SF60 on Sepharose CL-6B yielded an unadsorbed preparation (PgPeL) which contained all applied activity (Table 1). PgPeL, a glycoprotein (Figure 1A), was not stimulated by divalent ions, retained activity (titer of 4^{-1}) after heating, exhibited optimum pH of 7.5 (HA was abolished at pH 8.0) and was mainly inhibited by casein, fetuin or ovalbumin (titer of 8^{-1}); fructose and mannose were weaker inhibitors (titer of 64^{-1}). PgPeL was similar to *S. tuberosum* lectin in relation to optimum pH (Kilpatrick, 1980), however

it showed higher thermostability. PgPeL was resolved as a single polypeptide band upon PAGE for native acidic proteins (Figure 1B) and bands of approximately 25 (main), 35, 39 and 45 kDa on SDS-PAGE with (Figure 1C) or without β -mercaptoethanol.

PgPeL was successfully immobilized (204 μ g) onto FMD corresponding to coupling yields of 87%; similar efficiency was obtained when *Ricinus communis* agglutinin was immobilized on polymers-based supports (Cartellieri *et al.*, 2001). PgPeL-FMD was able to retain fetuin (160 μ g, salt eluted).

In conclusion, the results showed a simple and efficient procedure to prepare PgPeL and the lectin affinity adsorbent with high specific activities, which certainly will allow to evaluate its bioactive properties.

Acknowledgements. This paper was financially supported by the National Council for Technological and Scientific Development (CNPq). The authors are deeply grateful to the technical assistance of Maria Barbosa Reis da Silva.

References

- Cartellieri S, Helmholz H, Niemeyer B (2001) Preparation and evaluation of *Ricinus communis* agglutinin affinity adsorbents using polymeric supports. *Anal. Biochem.* **295**: 66-75.
- Davis BJ (1964) Disc electrophoresis II: Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**: 404-427.
- Kilpatrick DC (1980) Isolation of a lectin from the pericarp of potato (*Solanum tuberosum*) fruits. *Biochem. J.* **191**: 273-275.

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Paiva PMG, Coelho LCBB (1992) Purification and partial characterization of two isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). *Appl. Biochem. Biotech.* **26**: 113-118.
- Pinheiro SMP, Carvalho Jr LB, Chaves MEC (1999) The use of ferromagnetic dacron as solid-phase in chemiluminescent assays. *Biotechnol. Tech.* **13**: 919-922

Table 1- Summary of PgPeL purification

Preparation	Total protein (mg)	Titer ⁽⁻¹⁾	SHA	Yield* (%)	Purification (folds)
Extract	3,200	8,192	102	100	1
SF60	576	2,048	128	23	1.2
PgPeL	2.0	128	1103	100	10

*Percentage of total activity recovered. To hemagglutinating activity (HA) the lectin preparation (50 μ l) was serially two-fold diluted in 0.15 M NaCl before addition of 2.5% (v/v) suspension of rabbit glutaraldehyde treated erythrocytes (50 μ l). The titer was expressed as the highest dilution exhibiting hemagglutination. SHA, specific HA. Extraction used dried pericarp flour (10 g) and 0.15 M NaCl (100 ml); PgPeL, lectin isolated by chromatography on a Sepharose CL-6B column (4.3 x 0.8 cm) previously equilibrated (15 ml/h flow rate) with 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.5.

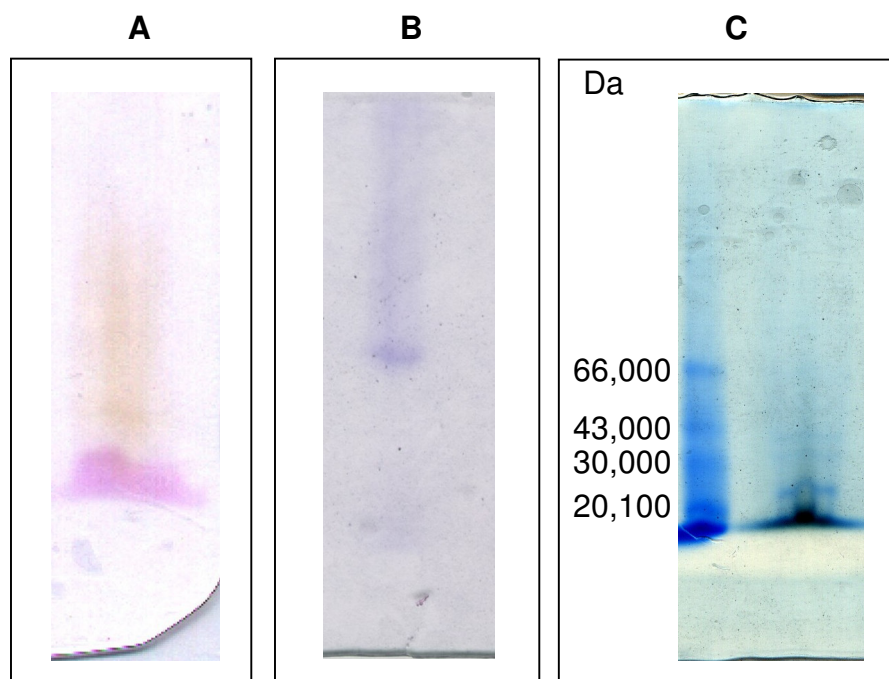


Figure 1. Electrophoretic patterns of PgPeL (100 µg of protein). SDS-PAGE (10%) under reducing conditions stained with Schiff's reagent (A); PAGE (12%) for native acidic proteins (B) and SDS-PAGE (7.5%) with β -mercaptoethanol (C) stained with Coomassie Brilliant blue. Molecular mass reference proteins were bovine serum albumin (66,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000) and soybean trypsin inhibitor (20,100).

6. CONCLUSÕES

1. Pericarpo de *Punica granatum* contém proteína com atividade hemaglutinante (PgPeL).
2. PgPeL foi extraída de farinha de pericarpo de *P. granatum* com NaCl 0,15 M e purificada por fracionamento salino com sulfato de amônio e cromatografia em coluna de Sepharose CL-6B.
3. PgPeL interage com eritrócitos humanos mas é principalmente ativa com células de coelho.
4. A atividade da lectina é inibida por glicoproteínas (caseína, fetuína, ovoalbumina e tiroglobulina) e monossacarídeos (frutose e manose) enquanto os íons cálcio e magnésio não interferem na atividade hemaglutinante.
5. PgPeL tem elevada estabilidade térmica e é sensível a pH alcalino (8,0).
5. Investigação eletroforética revelou que PgPeL é uma glicoproteína de natureza ácida, constituída de subunidade principal de massa molecular 25.000 Da.
6. PgPeL imobilizada em Dacron ferromagnetizado constitui uma matriz de afinidade para purificação de fetuína.