



Universidade Federal do ABC

Centro de Ciências Naturais Humanas - CCNH

Desenvolvimento de esferas de alginato de cálcio-goma guar para utilização como fase estacionária na purificação de jacalina.

ALESSANDRA MELLO DA ROCHA.

Santo André, SP
2014.



Universidade Federal do ABC

Centro de Ciências Naturais Humanas - CCNH

Desenvolvimento de esferas de alginato de cálcio-goma guar para utilização como fase estacionária na purificação de jacalina.

ALESSANDRA MELLO DA ROCHA.

RA: 11096008

Orientador: prof. Dr. Alexandre Zatkovskis Carvalho.

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, como requisito para obtenção do título de Bacharel em química.

Santo André, SP

2014.

Resumo:

O isolamento e purificação proteínas se tornaram processos de grande relevância para investigação científica e para a indústria. Um grupo particularmente importante de proteínas é o das lectinas, que se caracterizam pela capacidade de se ligar reversivelmente a resíduos específicos de açúcares, dentre as quais se destaca a jacalina, lectina presente no caroço da jaca e que apresenta especificidade por resíduos de D-galactose. Essa lectina é capaz de aglutinar eritrócitos de diferentes tipos de animais e inclusive do homem, independente do tipo sanguíneo, além de promover o estímulo células T CD4 e apresentar afinidade por IgA1.

Matrizes biológicas são complexas, por isso, métodos tradicionais para purificação de proteínas se caracterizam por apresentar grande número de etapas, baixa eficiência na purificação e um elevado tempo de execução, logo, o uso de técnicas e materiais que possibilitem uma melhor eficiência na separação de proteínas, com número reduzido de etapas é de grande interesse. A utilização da cromatografia de afinidade vem apresentando resultados eficientes, rápidos e cuja purificação é realizada através de uma única etapa. Tais resultados podem ser atribuídos ao tipo de material utilizado como fase estacionária na coluna de separação. Dentre os possíveis materiais a serem utilizados como fase estacionária em cromatografia de afinidade está o alginato de cálcio-goma guar, que neste projeto foi empregado como fase estacionária devido à afinidade da jacalina por resíduos de D-galactose presentes na estrutura da goma guar.

O emprego da fase estacionária constituída por alginato de cálcio – goma guar, reticulada com glutaraldeído demonstrou-se eficaz na purificação de jacalina por meio de cromatografia de afinidade. A técnica de SDS-PAGE revelou uma única banda após a etapa de cromatografia, com a obtenção de 5,0 mL de extrato purificado contendo $6,8\text{mgmL}^{-1}$ de jacalina.

Palavras chave: alginato de cálcio, cromatografia de afinidade, goma guar, jacalina.

Índice

1	Introdução.....	3
1.1	Métodos cromatográficos de separação de proteínas	3
1.2	Ácido algínico	3
1.3	Lectinas	4
1.3.1	Jacalina.....	5
1.4	Goma Guar	6
2	Objetivos	6
3	Materiais e métodos.....	7
3.1	Obtenção de farinha de semente de jaca e do extrato protéico bruto	8
3.2	Estudo do tempo de obtenção do extrato protéico bruto e quantificação de proteínas através do reagente de biureto	10
3.3	Estudo para preparação de esferas de CaAlg e CaAlg-Guar.....	10
3.4	Purificação do extrato protéico bruto e quantificação da jacalina.....	11
4	Resultados e discussões.....	11
4.1	Obtenção de farinha de semente de jaca e do extrato protéico bruto	11
4.2	Estudo do tempo de obtenção do extrato protéico bruto e quantificação de proteínas através do reagente de biureto	13
4.3	Estudo para preparação de esferas de CaAlg e CaAlg-GUAR	16
4.4	Purificação do extrato protéico bruto e quantificação da jacalina.....	18
5	Conclusões.....	19
6	Referências bibliográficas	19
7	Assinaturas	22

1 Introdução

1.1 Métodos cromatográficos de separação de proteínas

A cromatografia é uma técnica de separação onde uma amostra é transportada por uma fase móvel (gás, líquido ou fluído supercrítico) e forçada a passar através de uma fase estacionária[1]. Os métodos cromatográficos são divididos em diferentes categorias com base no mecanismo de interação entre soluto e fase estacionária, sendo estes: adsorção do soluto à superfície da fase estacionária devido a interações hidrofóbicas ou hidrofílicas, por partição entre dois líquidos, por troca iônica (oriunda das interações eletrostáticas entre íons do soluto e a fase estacionária), por exclusão molecular ou ainda por afinidade[2].

A cromatografia por afinidade utiliza de interações entre moléculas específicas do soluto e moléculas que se encontram covalentemente ligadas à fase estacionária[2]. Essa técnica tem sido aplicada com grande frequência para purificação de proteínas.

1.2 Ácido algínico

O ácido algínico é um biopolímero produzido de forma abundante por algas marrons e pertence à família dos polissacarídeos com estrutura não ramificada, com ligações β -D-(1 \rightarrow 4) entre resíduos de ácido β -D-manurônico (M) e de ácido α -L gulurônico (G), que podem estar em blocos únicos (MM) ou (GG), ou alternados (MG)[3], conforme ilustrado na figura 1. O produto de ionização do ácido algínico é o alginato, que em contato com soluções de cloreto de cálcio forma hidrógeis de alginato de cálcio (AlgCa) [4][5], material que é extensamente utilizado em biotecnologia para preparar nanocápsulas e microcápsulas usadas como veículo para administração de proteínas com liberação controlada [6] e como envelope de células ou ilhotas pancreáticas para transplante [7]. Este uso se deve à boa biocompatibilidade do ácido algínico, ausência de toxicidade, biodegradabilidade, gelificação controlada e propriedades de formação de filme [8].

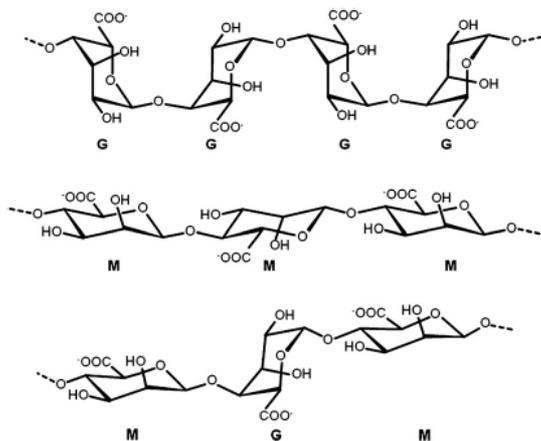


Figura 1: Estrutura química de bloco G (ácido gulurônico), bloco M (ácido manurônico) e bloco alternado MG (ácido gulurônico e ácido manurônico) - Extraído de LEE, 2012. [7]

Os hidrogéis de AlgCa e seus derivados podem ser empregados como fase estacionária para algumas separações cromatográficas por afinidade, incluindo a separação de algumas lectinas, como por exemplo, a jacalina, onde outro polissacarídeo, a goma guar (GUAR), é incorporado ao AlgCa através de ligações covalentes cruzadas [9]. Neste caso, é a GUAR a molécula responsável pelas interações de bioafinidade, conforme discutido adiante.

1.3 Lectinas

Lectinas pertencem à classe de glicoproteínas que se ligam de forma específica e reversível a açúcares[10]. Geralmente são constituídas por diferentes isoformas arranjadas em sua estrutura quaternária na forma de dímeros, tetrâmeros, heterodímeros, entre outros. As lectinas podem ser monovalentes, isto é, possuir um sítio glicídico por monômero, ou polivalentes, mais de um sítio ligante glicídico por monômero. [11]

As lectinas são amplamente distribuídas na natureza, sendo expressas por diversos organismos vivos, tais como: microorganismos, plantas (fitolectinas) e animais, tanto vertebrados como invertebrados [10]. Essas proteínas desempenham importantes atividades biológicas, principalmente a habilidade de reconhecer, de forma específica, e aglutinar

eritrócitos, linfócitos, espermatozóides, fungos, bactérias, partículas virais e células vegetais [11], razão pela qual as lectinas são também chamadas de aglutininas, representando um importante tópico de estudo. A jacalina (presente no caroço de jaca) e fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* – PHA (presente no grão do feijão) são exemplos de fitolectinas, extraídas de uma extensa lista [12]. Neste trabalho a extração e purificação da jacalina por cromatografia de afinidade serão abordadas.

1.3.1 Jacalina

A jacalina é uma lectina encontrada no caroço da *Artocarpus integrifolia*, popularmente chamada de jaca. Acredita-se que a origem desta fruta seja nas florestas tropicais da Índia, e que tenha se distribuído para o sudeste asiático, Filipinas, leste africano, Brasil e Suriname, tornando-se muito popular. Esta espécie adapta-se bem ao clima tropical úmido[13].

A jacalina apresenta especificidade por resíduos de D-galactose e apresenta estrutura tetramérica, constituída por cadeias α e β , podendo apresentar diversas isoformas [10].

Durante a revisão bibliográfica, ficou evidente que ainda não há um consenso sobre a massa molecular desta proteína, já que alguns autores mencionam como sendo 39,5 kDa [10], e outros como sendo 65-66 kDa[9, 14], no entanto, a cadeia α específica para reconhecimento de resíduos de D-galactose é sempre descrita como uma proteína de aproximadamente 10kDa[10,14,9].

A jacalina é capaz de aglutinar eritrócitos de diversas espécies de animais, incluindo humanos, sem discriminação entre os diferentes grupos sanguíneos. Dentre as diversas propriedades da jacalina está a sua aplicabilidade em estudos imunológicos, pois essa lectina estimula linfócitos T CD4, podendo ser utilizada para a avaliação do estado imune de pacientes soropositivos. Outra propriedade importante desta lectina está em sua afinidade pelas imunoglobulinas humanas IgA1, o que possibilita seu uso para o isolamento de

glicoproteínas plasmáticas, como IgA1 e proteína inibidora de C-1, na investigação de nefropatias por IgA e na detecção de tumores[10].

1.4 Goma Guar

A goma guar é um polissacarídeo de origem vegetal cuja massa molecular média é de 220 kDa, extraído do endosperma do feijão guar (*Cyamossistetragonolobus*). Sua estrutura apresenta uma cadeia linear de unidade de D-manopirranose unidas em β (1 \rightarrow 4), e ligadas por α (1 \rightarrow 6) aos resíduos de D-galactopirranose. Apresenta de 1,8 a 2 resíduos de manose para 1 de galactose [15, 16], conforme apresentado pela figura 2.

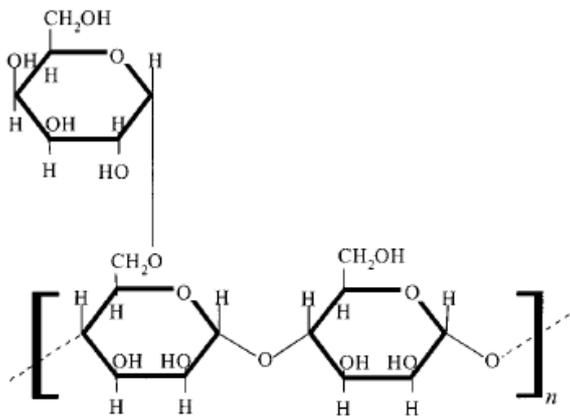


Figura 2: Estrutura goma guar - extraído de GITTING, 2000 [15].

A goma guar é um biopolímero solúvel em água, de alta viscosidade, que apresenta a possibilidade de formação de filmes, baixo custo e é biodegradável. É comumente utilizada na indústria alimentícia como agente espessante, na indústria farmacêutica como aglutinante, agente suspensor e estabilizante [17].

2 Objetivos

O objetivo deste projeto de pesquisa foi desenvolver uma metodologia para purificação em uma única etapa de jacalina extraída de sementes de jaca. Para isso estudamos e avaliamos esferas de alginato de cálcio - goma guar como fase estacionária para cromatografia por afinidade.

3 Materiais e métodos

No desenvolvimento desse projeto de pesquisa os seguintes reagentes foram utilizados: alginato de sódio marca Acros Organics (Geel, Bélgica), fosfato de sódio monobásico, sulfato de cobre, cloreto de sódio, hidróxido de sódio e tartarato de sódio e potássio todos da marca Synth (Diadema, Brasil), cloreto de cálcio Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), galactose 98% e albumina sérica bovina (BSA) da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil), goma guar marca Santa CruzBiotechnology (Califórnia, EUA), glutaraldeído 25% Cromoline (Diadema, Brasil). Todos os reagentes utilizados são de grau analítico (PA) ou de pureza superior.

As soluções preparadas foram obtidas através da pesagem do respectivo reagente em balança analítica marca BEL Engineering (São Paulo, Brasil), utilizou-se água deionizada (DI) obtida através de equipamento de osmose reversa da marca Quimis (Diadema, São Paulo). Para completa solubilização as soluções de alginato de sódio ficaram em agitação branda com barra magnética de um dia para o outro em erlenmeyer.

As jacas foram adquiridas no mercado local e suas sementes e a respectiva farinha foram pesadas em balança semi-analítica marca Acculab (EUA). Para centrifugação de extratos protéicos utilizou-se a centrífuga da marca Quimis modelo Q2227104 (Diadema Brasil).

As medidas espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro marca Fento 600S (São Paulo, Brasil) para leituras de absorvância em $\lambda = 550\text{nm}$ e o espectrofotômetro Sprechmax M5 (EUA) para leituras de absorvância em $\lambda = 280\text{nm}$. As medidas foram obtidas em cubeta de quartzo fundido sempre precedidos por medidas de um branco utilizando a mesma cubeta.

Para o preparo da solução de biureto utilizou-se 15mg de sulfato de Cobre e 60mg de tartarato de sódio e potássio. Os sais foram solubilizados em 50mL de água DI a e adicionou-se 30mL de solução de NaOH $0,75\text{molL}^{-1}$.

No preparo de 1L do tampão fosfato de sódio salino $0,15\text{molL}^{-1}$ pH 7,4 (PBS), utilizou-se 20,7g de fosfato de sódio monobásico e 9,0 g de cloreto de sódio. Os dois sais foram misturados e solubilizados com água DI. O pH da solução foi corrigido para 7,4 com solução de NaOH 3molL^{-1} em pHmetro marca Sartorius (São Paulo, Brasil).

Os parâmetros para a realização de eletroforese em gel (SDS-PAGE) foram: gel de resolução a 14% (corrida a 30mA) e gel de empilhamento a 4% (corrida a 20mA). Utilizou-se os padrões de peso molecular SM0431 (14,4KDa a 116kDa) e SM1881 (250KDa a 5KDa) ambos da marca Fermentas – Sinapse Biotecnologia (São Paulo, Brasil).

Para o preparo de esferas de alginato de cálcio (CaAlg), gotejou-se solução de alginato de sódio (NaAlg) por meio de uma seringa de 10mL montada com uma agulha de 0,6mm de diâmetro interno em solução de cloreto de cálcio. Do mesmo modo, esferas de CaAlg-goma guar foram obtidas, mas neste caso, o NaAlg foi dissolvido em solução 0,25% de goma guar, com e sem adição de agente reticulante (glutaraldeído) cuja concentração na solução final era de 0,5%. As esferas obtidas foram encubadas na solução de cloreto de cálcio por 1h. Após isso, as esferas foram filtradas, lavadas com água DI, e secas a temperatura ambiente por aproximadamente 1h.

Para a purificação do extrato protéico bruto, esferas de CaAlg-goma guar foram encubadas no extrato bruto por 15min. Após esse período realizou-se lavagem das esferas com PBS e posteriormente eluição com solução de D-galactose (em PBS).

3.1 Obtenção de farinha de semente de jaca e do extrato protéico bruto

As frutas (jacas) foram compradas no mercado local e suas sementes isoladas da polpa e lavadas com água deionizada (DI), secas a temperatura ambiente por 48 horas e

posteriormente descascadas e secas em estufa (DeLeo Equipamentos de Laboratório LTDA, Brasil) a 50°C por 24 horas. Pesou-se a massa das sementes antes e após a secagem para estimar-se a perda de água durante tal processo, conforme equação 1

$$y(\%) = \frac{m_{seca}}{m_{úmida}} \cdot 100 \text{ (Equação 1)}$$

Onde: m_{seca} corresponde à massa das sementes após a secagem em estufa e $m_{úmida}$ corresponde à massa das sementes antes do processo de secagem.

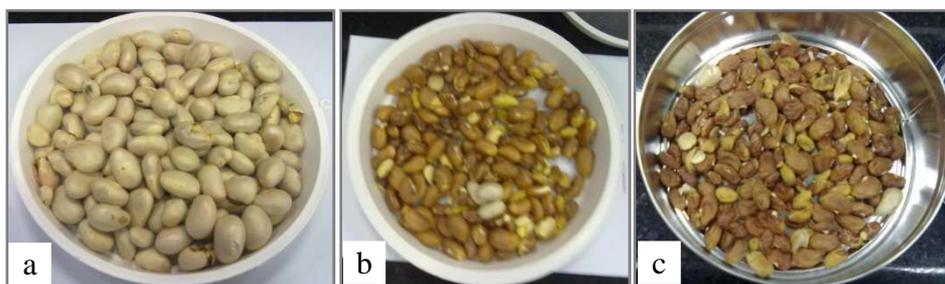


Figura 3: (a) Semente de jaca seca a temperatura ambiente por 48h e com casca; (b) Semente de jaca descascada; (c) Semente de jaca seca em estufa a 50°C por 24h.

As sementes secas foram trituradas em liquidificador comum para obtenção da farinha, que foi separada através de peneira (mesh 25, equivalente a furos de aproximadamente 0,7mm) em grossa (retido) e fina (passante).



Figura 4: Farinha de semente de jaca, à direita farinha mais grossa e à esquerda farinha mais fina.

A farinha de semente de jaca fina foi suspensa em PBS 0,15molL⁻¹ (pH 7,4) na proporção de 1:10 (m/v), isto é, adicionou-se 5,0g de farinha em tubo Falcon® de 50mL e em seguida adicionou-se 50mL de PBS. A farinha foi deixada em repouso em tampão PBS por 24h. O extrato protéico bruto obtido foi centrifugado por 20 min. a 8013g, e tanto o

sobrenadante como o sedimento, foram recolhidos e analisados com biureto. Após análise, o extrato obtido foi congelado em freezer.

3.2 Estudo do tempo de obtenção do extrato protéico bruto e quantificação de proteínas através do reagente de biureto

Em tubo Falcon® de 50mL adicionou-se 3,0g de farinha e 30mL de PBS pH 7,4. Repetiu-se esse procedimento mais uma vez. Os tubos foram identificados como processamento simples (S) e processamento duplo (H), neste caso, a mistura contida no tubo foi reprocessada em homogeneizador da marca Quimis (Diadema, São Paulo) a velocidade de 7000rpm, por 20 min. Utilizando a reação de biureto mediu-se a absorbância de tais misturas em 550nm nos seguintes tempos: inicialmente (40 minutos), 1 hora, 2 horas, 3 horas e 4 horas. Realizou-se separação por eletroforese (SDS-PAGE), para o extrato bruto de 2 h e de 24h.

As absorbâncias de soluções de BSA com concentração 0,25%, 0,75%, 1,25% e 1,75% (m/v) foram medidas em 550nm utilizando a reação de biureto, assim como o extrato protéico bruto obtido pela extração de 24h.

3.3 Estudo para preparação de esferas de CaAlg e CaAlg-Guar

Solução de NaAlg 1% (m/v) e cloreto de cálcio $0,1\text{molL}^{-1}$ foram utilizados para o preparo de esferas de CaAlg como descrito em materiais e métodos. A estabilidade física das esferas foi avaliada em tampão PBS, que é o meio usado para extração da jacalina. O teste com PBS consistiu em imergir as esferas em solução de PBS e analisar visualmente o aspecto após 10 min. de contato com a solução.

Esferas de CaAlg-Guar foram preparadas como descritos em materiais e métodos, para isso, utilizou-se solução de NaAlg 0,75% e solução de CaCl_2 $0,5\text{molL}^{-1}$. Houve também preparação de esferas CaAlg-Guar com glutaraldeído, por dois meios:

- Adição de 1mL de solução comercial de glutaraldeído após o período de encubação das esferas em 50mL de cloreto de cálcio, e encubação por mais 10min.
- Adição de 0,2mL de solução comercial de glutaraldeído antes da formação das esferas, isto é, junto à 10mL de solução de NaAlg-Guar.

As esferas de CaAlg-Guar obtidas por cada um dos processos descritos acima foram divididas em 3, isto é, uma para controle, outra para coloração com solução de azul de metileno e outro para teste com PBS (contato após 10min.).

3.4 Purificação do extrato protéico bruto e quantificação da jacalina

O processo de purificação do extrato bruto protéico foi realizado como descrito nos materiais e métodos, para isso utilizou-se de 5,0g de esferas de CaAlg-Guar e 10mL de extrato bruto. Utilizou-se 20 mL de PBS para lavagem e 10mL de D-galactose $0,1\text{molL}^{-1}$ (em PBS) para eluição. As frações recolhidas neste processo foram analisadas por SDS-PAGE.

As absorvâncias de soluções de BSA com concentração 0, 109%, 0, 218%, 0, 437%, 0, 875% e 1, 750% (m/v) foram medidas em 280nm. Do mesmo modo, realizou-se a leitura de absorvância da fração recolhidas durante o processo de purificação da jacalina.

4 Resultados e discussões

4.1 Obtenção de farinha de semente de jaca e do extrato protéico bruto

De uma massa seca de 365,68 g de sementes foram obtidos 174,63 g, conforme procedimento descrito em materiais e métodos, o que representa uma umidade de 47,75%.

Como apresentado por Kabir [14], a jacalina se arranja de forma tetramérica, e possui ponto isoelétrico (PI) entre 4 – 5, nesse sentido o uso de um tampão de extração com pH distante do PI é mais eficiente para a obtenção da proteína devido ao aumento de solubilidade causado por ionização. Em tampão pH 7,4 os grupamentos ácidos das lectinas estão desprotonados, permitindo a extração da jacalina para o tampão PBS. O material insolúvel foi

separado por centrifugação e o sobrenadante foi reservado. Para comprovar a presença de lectinas no sobrenadante o teste de biureto foi realizado. Esse teste baseia-se no fato de que íons Cu^{2+} formam complexos de coloração violeta (absortividade máxima em 550 nm) com os aminoácidos presentes em proteínas, estabelecendo interações com os átomos de nitrogênio da cadeia peptídica (Figura 5):

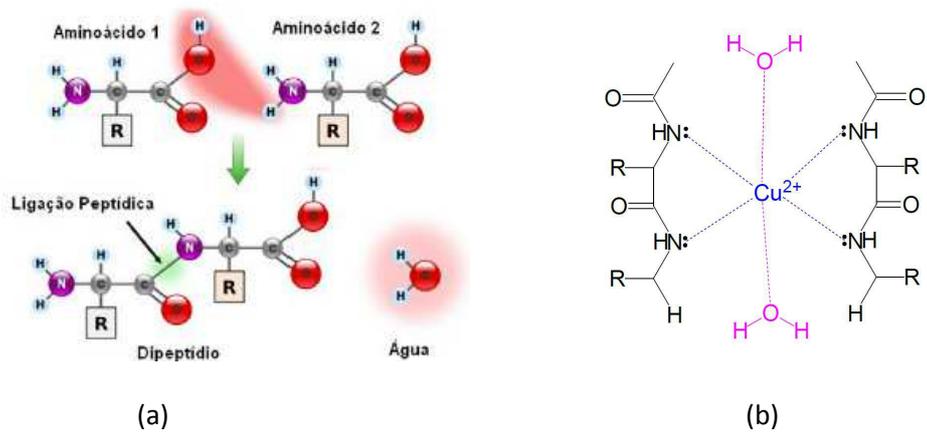


Figura 5: (a) Representação da formação da ligação peptídica entre aminoácidos (b) representação da interação entre íons cobre e os átomos de nitrogênio da cadeia peptídica – Extraído de Almeida et al., 2013 [18].

A leitura de absorbância, neste tipo de teste, pode ser utilizada de forma quantitativa, pois quanto maior for à quantidade de proteínas, maior será a absorbância.

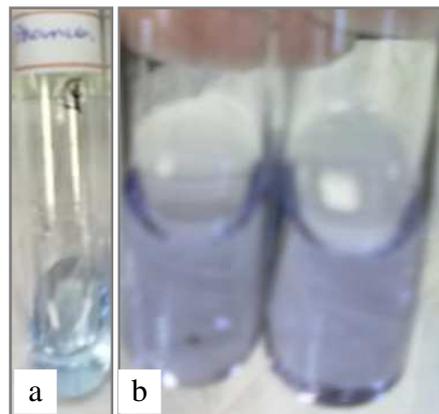


Figura 6: Resultado do teste de biureto para o extrato protéico bruto da farinha de semente de jaca. (a) Branco (solução de biureto com água), (b) Extrato bruto da farinha de semente de jaca com reagente de biureto.

Como pode ser observado na figura 6, o teste de biureto para o sobrenadante do extrato bruto de farinha de semente de jaca foi positivo (coloração violeta), o que indica há presença de proteínas no sobrenadante.

O resíduo (sedimento) foi ressuspensionado com PBS e deixado em repouso por 24h, realizou-se uma nova centrifugação e teste de biureto no sobrenadante, mas o resultado da análise com biureto foi negativo para presença de proteínas, logo o mesmo foi descartado e adotou-se uma simples extração.

4.2 Estudo do tempo de obtenção do extrato protéico bruto e quantificação de proteínas através do reagente de biureto

Tabela 1: Resultado da absorvância para as amostras de extrato protéico de jaca com extração de 24h a 550nm.

Amostra	Absorbância	Abs. Proteína complexada
Branco:Biureto	0	
0,5mL Proteína de jaca (sobrenadante) + 1mL de água	0,089	$0,287 - 0,089 = 0,198$
0,5mL Proteína de jaca (sobrenadante) + 1mL de Biureto	0,287	

Foi realizado um teste em paralelo checar se a absorvância em 550nm do PBS pH 7,4 e da água DI apresentavam diferença significativa entre si, para isso mediu-se a absorvância de uma amostra de 3mL de PBS e uma amostra de 3mL de água DI. A diferença entre as absorvâncias do PBS e da água neste comprimento de onda não foram significativas, isto é, inferiores a 0,001, logo concluímos que a utilização de água como branco de leitura não propiciaria nenhum erro significativo na leitura final, uma vez que o extrato protéico bruto está em PBS.

Conforme pode ser observado na tabela 1, o extrato bruto apresenta absorvância em 550 nm, decorrente da presença de outras substâncias extraídas juntamente com as proteínas. Dessa forma além do branco com biureto, outro branco foi necessário para a determinação. Se

considerarmos os resultados apresentados na tabela 1, o valor de proteína no extrato bruto de jaca com biureto menos o valor de proteína no extrato bruto de jaca com a mesma quantidade de água (branco) corresponde ao valor de absorvância do total de proteína complexada com cobre.

Como não tínhamos a nossa disposição um padrão de jacalina (custo atual para o padrão de jacalina é R\$ 286,00 por 5mg [18]), utilizamos BSA como padrão para estimar a concentração de proteína total no extrato bruto, o que é possível devido à baixa seletividade do teste de biureto. Os resultados de absorvância x concentração de BSA estão dispostos na tabela 2:

Tabela 2: Valores de absorvância em 550nm dos padrões de BSA.

Solução	Abs. em 550nm
Branco (água e biureto)	0
1 – 0,25% BSA	0,058
2 – 0,75% BSA	0,208
3 – 1,25% BSA	0,334
4 – 1,75% BSA	0,418

A equação da reta obtida a partir de tais resultados foi:

$$y = 0,246x + 0,006 - R^2 = 0,990 \text{ (Equação 2)}$$

A partir da curva de calibração feita com BSA, temos que a quantidade de proteína total complexada com cobre presente no extrato bruto (extração de 24h) equivale a 0,78% (m/v), isto é, 7,8mgmL⁻¹. Logo a massa extraída de proteínas no extrato bruto equivale a 3,9mg o que corresponde a 0,062% em relação à massa de farinha de jaca utilizada para obtenção do extrato bruto de 24h.

Com intuito de verificarmos a real necessidade de deixarmos a farinha da semente de jaca em PBS por 24h, comparou-se a absorvância entre amostras de extrato protéico bruto para diferentes tempos, conforme apresentado na tabela 3:

Tabela 3: Valores de absorvância em 550nm para extratos obtidos com diferentes tempos e condições

Tempo	Amostra	Abs η	Abs θ	Abs τ
Inicial (40 min.)	#	0,207	0,050	0,157
	§	0,400	1,00	-
1 hora	#	0,211	0,015	0,196
	§	0,316	0,124	0,192
2 horas	#	0,198	0,004	0,194
	§	0,378	0,121	0,257
3 horas	#	0,211	0,098	0,113
	§	0,399	0,181	0,218
4 horas	#	0,294	0,126	0,168
	§	0,348	0,048	0,300

amostra - processada simples (S); § amostra – processamento duplo (H); η = 0,5mL de jaca + 1mL de biureto; θ = 0,5mL de jaca + 1mL de água; τ = Quantidade de proteína complexada com cobre.

O valor de absorvância no tempo inicial, não pode ser considerado em virtude do resultado apresentado para leitura de absorvância do extrato bruto em 550nm, que foi igual a 1,00, pois este valor está associado à presença em grande quantidade de material particulado nesta primeira alíquota.

Como podemos observar na tabela 3, com duas horas o valor de absorvância correspondente a amostra §, foi superior ao encontrado para o teste anterior (Absorvância = 0,198). Para evidenciarmos a presença da jacalina no extrato bruto tanto de 2h como de 24h realizou-se a análise por SDS-page, conforme figura 7. Nessa figura, acreditamos que a banda que aparece logo abaixo a unidade de 14kDa do marcador de peso molecular seja correspondente a jacalina.

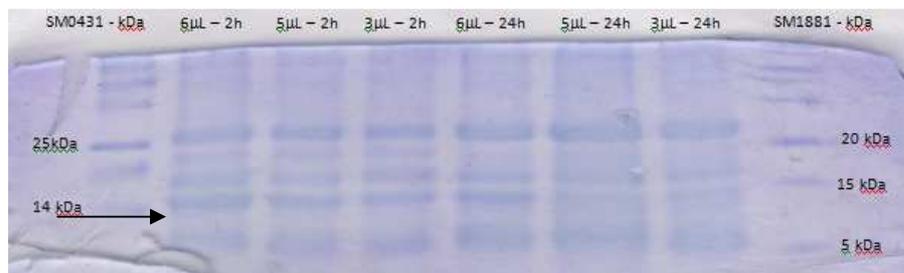


Figura 7: SDS-PAGE do extrato bruto obtido em 24h com PBS e 2h com PBS e homogeneização; Gel corado com Comassie Blue por 24h e descorado com solução 40% metanol e 10% ácido acético (v/v).

4.3 Estudo para preparação de esferas de CaAlg e CaAlg-GUAR

Ao gotejarmos solução contendo alginato em solução com íons cálcio há formação de esferas (hidrogéis) de CaAlg. A formação de tais esferas ocorre devido à interação de cátions divalentes com as regiões do bloco gulurônico (G) do alginato. Tal interação ocorre com estequiometria 2:1, isto é, um resíduo de ácido gulurônico para cada Ca^{2+} . A estrutura originada a partir de tal interação tem cavidades na forma de losango, conhecida como caixa de ovos (modelo *egg-box*) [7].

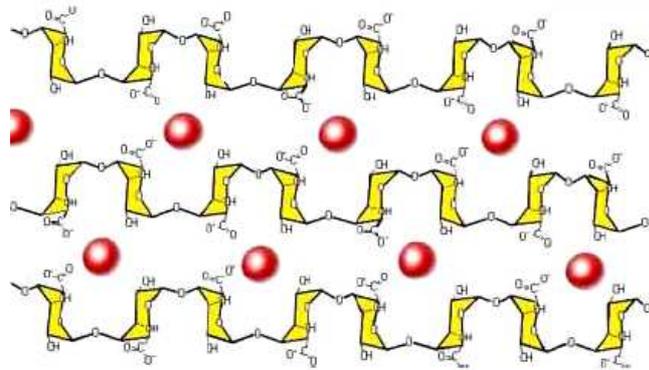


Figura 8: Representação esquemática da formação de hidrogéis através de interações entre íons cálcio com os grupos carboxílicos do alginato de sódio – Extraído de ABREU, 2008 [5].

Ao realizarmos o teste com tampão PBS, as esferas de CaAlg solubilizaram, isso ocorreu, pois os íons Ca^{2+} presentes nas esferas de alginato interagem com os íons fosfato presente no tampão PBS, o que destrói a estrutura da “caixa de ovos”. Logo, a utilização de esferas de alginato de cálcio como fase estacionária na purificação de proteínas que estejam em tampão PBS está comprometida.

Uma solução para isso é a utilização de um agente reticulante, que forneça estabilidade química e estrutural frente ao PBS. Por esse motivo, esferas compostas por CaAlg e com outro polissacarídeo com afinidade pelo material de interesse, que neste caso é a jacalina foram preparadas utilizando-se glutaraldeído como agente reticulante. Como apresentada na revisão bibliográfica, a jacalina é uma lectina que apresenta especificidade por resíduos de D-galactose, e a goma guar possui tais resíduos, por isso, se justifica a utilização da mesma na

constituição das esferas de CaAlg para purificação desta lectina. No entanto, em testes preliminares verificou-se que em baixas concentrações de NaAlg, e excesso de Guar não há formação de esferas. Como indicado na literatura, à proporção ideal de alginato: Guar é 3:1 [20].

Na figura 9 são apresentadas fotos das esferas de CaAlg-Guar:

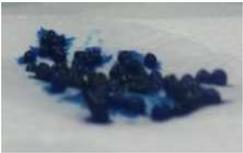
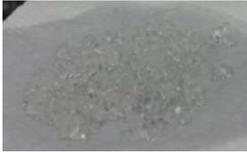
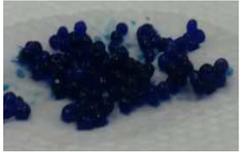
Formação da Esfera	Controle	Esferas coradas c/ azul de metileno	Esferas após PBS	Resultado após PBS
1				-
2				-
3				+

Figura 9: 1 - esferas de CaAlg-Guar sem glutaraldeído; 2 - esferas de CaAlg-Guar com 1mL de glutaraldeído após cura em CaCl₂; 3 - esferas de CaAlg-goma guar com 0,2mL de glutaraldeído adicionado no NaAlg-Guar; (-) esferas dissolveram em PBS; (+) esferas permaneceram intactas após PBS.

De acordo com o teste de coloração com azul de metileno, podemos observar que o formato das esferas de Ca-Alg-Guar foi relativamente uniforme.

Após contato com a solução de PBS, as esferas formadas sem adição de glutaraldeído se solubilizaram. Do mesmo modo as esferas de CaAlg-Guar com adição de glutaraldeído após a sua formação apresentaram uma leve solubilização após contato com PBS. As esferas de CaAlg - Guar com adição de glutaraldeído antes da formação de esferas foram as que apresentaram melhor resistência frente ao PBS, logo consideramos esse processo como sendo o mais eficiente para produção das esferas de CaAlg- Guar.

4.4 Purificação do extrato protéico bruto e quantificação da jacalina

A análise por SDS-PAGE revelou há presença de uma única banda após eluição com D-galactose (figura 10). Essa banda aparece com migração próxima ao padrão de 10kDa, tamanho esperado para a jacalina.

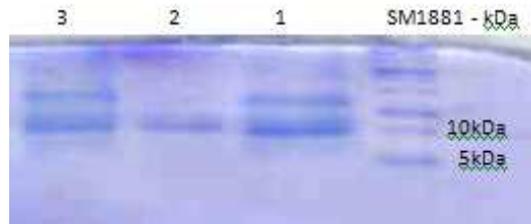


Figura 10: SDS-PAGE: 1 - amostra de extrato bruto após contato com as esferas de CaAlg- Guar; 2 – amostra após eluição com D-galactose; 3 – amostra após lavagem com PBS; Gel revelado conforme figura 7.

Para estimar a quantidade de lectina purificada, foi realizada uma nova curva de calibração para o BSA a 280nm. Neste caso, o teste de biureto na fração purificada não pode ser realizado devido à presença de D-galactose, que contém em sua estrutura molecular aldeído livre (reduzidor), logo a reação com íons cobre poderia comprometer o teste de quantificação. Os resultados de absorvância x concentração de BSA estão dispostos na tabela abaixo:

Tabela 4: Valores de absorvância em 280nm dos padrões de BSA.

Solução	Abs. em 280nm
Branco (água)	0
1 – 0,219% BSA	0,134
2 – 0,438% BSA	0,188
3 – 0,875% BSA	0,156
4 – 1,75% BSA	0,230

A equação da reta obtida a partir de tais resultados foi:

$$y = 0,060x + 0,124 - R^2 = 0,990 \text{ (Equação 3)}$$

Para a fração eluída com D-galactose o valor de absorvância em 280nm foi de 0,165. A partir da curva de calibração feita com BSA, temos que a quantidade jacalina equivale a 0,68% (m/v), isto é, 6,8mgmL⁻¹.

5 Conclusões

A utilização de esferas de CaAlg-Guar para purificação de jacalina não se mostrou um processo eficiente em virtude da baixa estabilidade das esferas de CaAlg em PBS, no entanto o *crosslink* com glutaraldeído proporcionou um material estável de CaAlg-Guar. Através da incorporação de resíduos de galactose, oriundos da goma guar, foi possível preparar um meio bioseletivo eficaz para a purificação de jacalina em única etapa. Muito ainda pode ser estudado sobre a possibilidade de variação de outros polímeros de afinidade para purificação desta lectina, além de estudos para obtenção de esferas de menor diâmetro (e maior superfície de contato relativa) para separações mais eficientes. Além disso, o material ainda poderá ser testado para empacotamento de colunas para separações em fluxo.

6 Referências bibliográficas

- [1] SOOK, D. A; HOLLER, F. J. e CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**, Porto Alegre: Bookman, 6ed, pp. 776-777, 2009.
- [2] HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. Rio de Janeiro : LTC, 6ed, pp. 543-545, 2005.
- [3] BUZZI, V. **Microesferas de polissacarídeos por redes poliméricas interpenetrantes (RPI) para o estudo e modulação do perfil de liberação do Piroxicam**, 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processo) - Universidade da região de Joinville, Joinville, pp. 22-23.
- [4] OLIVEIRA, A. F. **Desenvolvimento, caracterização e aplicação de biofilmes e esferas obtidas a partir de carboximetilcelulose e alginato de sódio em processos de liberação controlada de nutrientes**, 2009. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, pp. 9-10.

- [5] ABREU, F. O. M. S. **Síntese e caracterização de hidrógeis biodegradáveis à base de quitosana com morfologia controlada com potencial aplicação como carregadores de fármacos**, 2008. Tese (Doutorado em Engenharia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, pp. 35.
- [6] TØNNESEN, H.H.; KARLSEN, J. **Alginate in drug delivery systems**. Drug Development and Industrial Pharmacy, v. 28, pp. 621-630, 2002.
- [7] LEE, K.Y.; Mooney, D.J. **Alginate: Properties and biomedical applications**. Progress in Polymer Science, v. 37, pp. 106-126, 2012.
- [8] LERTSUTTHIWONG, P.; NOOMUM, K.; JONGAROONNGAMSANG, N, ROJSSITTISAK, P & NIMANNIT, U. **Preparation of alginate nanocápsulas containing turmeric coil**, Carbohydrate Polymers, v. 74, pp. 209–214, 2008.
- [9] ROY I.; Sardar, M; Gupta, M. N. **Cross-linked alginate-guar gum beads as fluidized bed affinity media for purification of jacalin**. Biochemical Engineering, v. 23, pp.193-198, 2005.
- [10] SELL, A. M, e COSTA, C. P. **Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina**. Acta Scientiarum, v. 22, pp. 297-303, 2000.
- [11] SANTANA, M. A. **Isolamento, propriedades bioquímicas e estudos biológicos da lectina de sementes da Macrotylomaaxillare**, 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade de Ouro Preto, Ouro Preto, pp. 2.
- [12] POVINELI, K.L.; FINARDI FILHO, F. **The multiple functions of plant lectins**, Revista da Sociedade brasileira de Alimentação e Nutrição, v. 24, p.135-156, 2002.
- [13] TRINDADE, M. B. **Purificação, caracterização e estudos estruturais de duas novas lectinas ligantes de quitina das sementes do gênero Artocarpus**, 2005. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos, pp.17.

- [14] KABIR, S. **Jacalin: A jackfruit (*Artocarpusheterophyllus*) seed-derives lectin of versatile application in immunobiological research.** Journal of Immunological Methods, v. 212, pp. 193-211, 1998.
- [15] GITTINGS, M. R. et all. **Structure of Guar in Solutions of H₂O and D₂O: An Ultra-Small-Angle Light-Scattering Study**, Journal of Physical Chemistry, v. 104, pp. 4381-4386, 2000.
- [16] FERREIRA, G. M. **Estudo das propriedades reológicas do sistema polpa de cupuaçu – Biopolímeros**, 2008. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, pp. 22.
- [17] ZORNIO, C. F. **Preparação e caracterização de microesferas de goma guar reticulada com EDC**, 2010. Relatório (Estágio supervisionado II) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, pp. 17.
- [18] ALMEIDA, V. V, et all. **Análise qualitativa de proteínas em alimentos por meio de reação de complexação do íon cúprico.** Química Nova na Escola, v. 35, pp. 34-40, 2013.
- [19] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?interface=All&term=jacalin&N=0&mode=match%20partialmax&focus=product&lang=pt®ion=BR> – Acessado em 06/04/2014.
- [20] GEORGE, M. ABRAHAM T.E. **pH sensitive alginate–guar gum hydrogel for the controlled delivery of protein drugs**, International Journal of Pharmaceutics, v. 335, pp. 123–129, 2007.

7 Assinaturas

Alessandra Mello da Rocha

Prof. Dr. Alexandre Zatkovskis Carvalho.