



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**BRUNA MARIA NEPOMUCENO SOUSA LINO**

**UTILIZAÇÃO DA GALACTOMANANA DE SEMENTES DE ALGAROBA**  
**(*Prosopis juliflora*) COMO MATRIZ CROMATOGRÁFICA DE AFINIDADE PARA**  
**A PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS GALACTOSE-LIGANTES**

**FORTALEZA**

**2019**

BRUNA MARIA NEPOMUCENO SOUSA LINO

UTILIZAÇÃO DA GALACTOMANANA DE SEMENTES DE ALGAROBA (*Prosopis juliflora*) COMO MATRIZ CROMATOGRÁFICA DE AFINIDADE PARA A PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS GALACTOSE-LIGANTES

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Oliveira Tavares

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- L73u Lino, Bruna Maria Nepomuceno Sousa.  
Utilização da galactomanana de sementes de algaroba (*Prosopis juliflora*) como matriz cromatográfica de afinidade para a purificação de proteínas galactose-ligantes / Bruna Maria Nepomuceno Sousa Lino. – 2019.  
26 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva.  
Coorientação: Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Tavares.
1. Gomas endospermicas. 2. Galactomanana. 3. Matriz cromatográfica de afinidade. I. Título.  
CDD 661
-

BRUNA MARIA NEPOMUCENO SOUSA LINO

UTILIZAÇÃO DA GALACTOMANANA DE SEMENTES DE ALGAROBA (*Prosopis juliflora*) COMO MATRIZ CROMATOGRÁFICA DE AFINIDADE PARA A PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS GALACTOSE-LIGANTES

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em 14/11/2019

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Tavares  
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

---

Msc. Wallady da Silva Barroso  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Deus.

À minha avó, Fransquinha, e  
a minha mãe, Francisca  
Maria.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por ter sido a força que me manteve caminhando.

Ao Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva por ter me acolhido, pela orientação, paciência, disponibilidade e ensinamentos.

Aos membros da banca Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Tavares pela co-orientação, paciência e disponibilidade; e ao Me. Wallady da Silva Barroso por aceitar contribuir com o aperfeiçoamento desse trabalho, dedicando seu tempo e conhecimento.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Molecular (LabBMol), Samara, Fábio, Wallady, Talita, Vanessa, Jéssica, Germana, Samuel, Leonardo, Samilly, Elaine e Thiago pelo companheirismo, apoio e conhecimento compartilhado. Sou muito grata por ter tido a oportunidade de vivenciar essa experiência ao lado de vocês.

À minha avó, Fransquinha, por ser exemplo, por sempre me apoiar e me incentivar. À minha mãe, Francisca Maria, por todo o cuidado, dedicação e encorajamento.

Aos meus amigos Ronaldo Júnior, Glenda, Jéssica Emanuela, Marcus Rafael e Jamili por toda ajuda, ombro amigo e torcida para que tudo desse certo.

À Bárbara Serpa Mugunba, por toda paciência, dedicação e profissionalismo. Muito obrigada por ter me ajudado nessa jornada.

À Coordenação do Bacharelado em Biotecnologia, em especial a pessoa do Gilmar, por sempre ser muito solícito e não medir esforços para ajudar quando preciso.

À Universidade Federal do Ceará, pela estrutura concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Carboidratos são biopolímeros complexos muito encontrados na natureza, possuindo diversas funções e aplicações. Uma dessas aplicações deve-se a sua capacidade de ser reconhecido de forma específica por uma classe de proteínas. Dessa forma, pode-se utilizar alguns carboidratos como insumo na produção de uma matriz cromatográfica de afinidade para purificar classes específicas de proteínas ligantes a carboidratos, como algumas classes de RIP (Ribosome Inactivating Proteins) e de CBM (*Carbohydrate-Binding Module*). Sabendo-se das propriedades da galactomanana, um polissacarídeo muito comum em sementes de leguminosas, o presente trabalho consistiu em avaliar a viabilidade técnica da purificação de proteínas galactose-ligantes utilizando uma matriz cromatográfica de afinidade de galactomanana de sementes de algaroba (*Prosopis juliflora*), espécie muito difundida no semiárido nordestino brasileiro. As vagens foram imersas em água e trituradas sutilmente a fim de facilitar a separação das cápsulas, para produção da farinha. O carboidrato foi isolado por precipitação em etanol, e em seguida foi centrifugado e liofilizado. O pó de galactomanana refinada foi utilizado para reticulação com epícloridrina, resultando na produção de uma matriz cromatográfica. Para comprovar sua funcionalidade, a matriz cromatográfica foi testada com extratos brutos totais (EBTs) de *Artocarpus incisa*, *Artocarpus integrifolia*, *Abrus precatorius* e *Ricinus communis*, por meio da purificação de Frutalina, Jacalina, Abrina e Ricina, respectivamente. Para atestar a eficiência da purificação e a integridade funcional dessas proteínas, as mesmas foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e atividade hemaglutinante. Através da visualização do perfil eletroforético, pôde-se confirmar a purificação das moléculas citadas, utilizando coloração com Comassie Brilhante R-250. Para o ensaio funcional, observou-se que todas as proteínas purificadas apresentaram a atividade hemaglutinante. Apesar da matriz ter se mostrado eficiente na purificação das moléculas propostas, outros ensaios comparando rendimento, grau de pureza e atividade específica das proteínas em relação a matrizes comerciais são necessários, visando o desenvolvimento de um produto biotecnológico mais refinado.

**Palavras-chaves:** Gomas endospérmicas. Galactomanana. Matriz cromatográfica de afinidade.

## ABSTRACT

Carbohydrates are complex biopolymers found in nature with various functions and applications. One of those applications is due to its ability to be specifically recognized by a protein class. Therefore, several carbohydrates may be used as a source to produce chromatographic matrices to purify specific classes of carbohydrate-binding proteins, as some classes of RIPs (Ribosome Inactivating Proteins) and CBM (Carbohydrate-Binding Modules). Knowing the properties of galactomannan, a polysaccharide very common in leguminous seeds, the present work aimed to evaluate the technical viability of galactose binding protein purification using a galactomannan affinity chromatographic matrix of mesquite seeds (*Prosopis juliflora*), a widespread species in the Brazilian northeastern semiarid. The pods were immersed in water and mildly ground to facilitate capsule separation in order to produce a powder. The carbohydrate was isolated by ethanol precipitation and then centrifuged and lyophilized. Powder containing refined galactomannan was used for reticulation with epichlorohydrin, resulting in a chromatographic matrix production. In order to prove its functionality the chromatographic matrix was tested using total crude extract of *Artocarpus incisa*, *Artocarpus integrifolia*, *Abrus precatorius* and *Ricinus communis*, through purification of Frutalin, Jacalin, Abrin and Ricin, respectively. To certify purification efficiency and functional integrity of these proteins, they were all evaluated by polyacrylamide gel electrophoresis and haemagglutination assay. Visualization of electrophoretic profile confirmed the purification of the cited molecules, using Coomassie Brilliant Blue R-250 dye. For the functional assay, it was seen that the all purified proteins presented expected haemagglutination activity. Even though the matrix showed to be efficient for purification of all proposed molecules, other assays comparing yield, purity and specific activity of the proteins compared to commercial methodologies are necessary, aiming the development of a more refined biotechnological product.

**Keywords:** Endospermic gum. Galactomannan. Chromatography affinity matrix.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 - Estrutura de homo e heteropolissacarídeos .....  | 14 |
| Figura 2 - Estrutura básica de uma semente dicotiledônea .....  | 15 |
| Figura 3 - Estruturas químicas dos principais polissacarídeos de reserva de parede celular que ocorrem em sementes e os monossacarídeos que os constituem ..... | 17 |
| Figura 4 - Estrutura molecular geral da galactomanana .....   | 20 |
| Figura 5 - SDS-Page de <i>Artocarpus incisa</i> e <i>Artocarpus integrifolia</i> .....  | 38 |
| Figura 6 - SDS-Page de <i>Abrus precatorius</i> e <i>Ricinus communis</i> .....   | 39 |
| Figura 7 - Ensaio de atividade hemaglutinante dos picos retidos (PII) de <i>Artocarpus incisa</i> e <i>Artocarpus integrifolia</i> .....                        | 41 |
| Figura 8 - Ensaio de atividade hemaglutinante dos picos retidos (PII) de <i>Abrus precatorius</i> e <i>Ricinus communis</i> .....                               | 42 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|  |    |
|--|----|
| Gráfico 1 - Gráfico de DSC da galactomanana de algaroba .....  | 34 |
| Gráfico 2 - Análise termogravimétrica da galactomanana de algaroba .....   | 35 |
| Gráfico 3 - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier da galactomanana de algaroba .....   | 36 |
| Gráfico 4 - Purificação da frutalina ( <i>A. incisa</i> ), jacalina ( <i>A. integrifolia</i> ), abrina ( <i>A. precatorius</i> ) e ricina ( <i>R. communis</i> ) por cromatografia de afinidade em coluna de galactomanana de algaroba ..... | 37 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Fontes usuais de alguns polissacarídeos vegetais .....   | 18 |
| Tabela 2 - Rendimento médio de extrações de galactomanana .....   | 33 |
| Tabela 3 - Quantificação de proteínas nos extratos brutos totais (EBTs) e picos retidos de <i>A. incisa</i> , <i>A. integrifolia</i> , <i>A. precatorius</i> e <i>R. communis</i> ..... | 40 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

|                        |   |
|------------------------|---|
| $\mu\text{L}$          | Microlitro  |
| <i>A. incisa</i>       | <i>Artocarpus incisa</i>                                      |
| <i>A. integrifolia</i> | <i>Artocarpus integrifolia</i>                                |
| <i>A. precatorius</i>  | <i>Abrus precatorius</i>                                      |
| CAPES                  | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior   |
| CE                     | Ceará   |
| CNPq                   | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| DBBM                   | Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular               |
| DSC                    | Calorimetria Exploratória Diferencial                         |
| EBT                    | Extrato bruto total   |
| EMBRAPA                | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária                   |
| <i>et al.</i>          | E outros, do latim <i>Et alii</i>                             |
| FTIR                   | Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier   |
| g                      | Gramma  |
| GBME                   | Grupo de Biotecnologia Molecular e Estrutural                 |
| Gm                     | Galactomanana   |
| h                      | Hora  |
| Hemoce                 | Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará                  |
| IFCE                   | Instituto Federal do Ceará                                    |
| J                      | Joule   |
| kDa                    | Quilo Dalton  |
| kg                     | Quilograma  |
| LabBMol                | Laboratório de Biotecnologia Molecular                        |
| LABIC                  | Laboratório de Biocristalografia                              |
| M                      | Molar   |
| $\text{mA}$            | Miliampere  |
| min                    | Minuto  |
| mL                     | Mililitro   |
| mM                     | Mili mols por Litro   |
| mm                     | Milímetro   |
| <i>Mr</i>              | Massa relativa  |
| NaCl                   | Cloreto de sódio  |
| NaOH                   | Hidróxido de sódio  |

|                    |  |
|--------------------|--|
| p/v                | Relação Peso Volume  |
| PBS                | Tampão fosfato salino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>  |
| pH                 | Potencial hidrogeniônico   |
| PI                 | Pico não-retido  |
| PII                | Pico retido  |
| <i>R. communis</i> | <i>Ricinus communis</i>  |
| RPM                | Rotação por minuto   |
| SDS-PAGE           | Eletroforese em gel de poliacrilamida com presença de dodecil sulfato de sódio, do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> |
| seg                | segundo  |
| Tg                 | Temperatura de transição vítrea  |
| TGA                | Análise Termogravimétrica  |
| Tris-HCl           | Tampão a base de (hidroximetil)aminometano e ácido clorídrico  |
| UFC                | Universidade Federal do Ceará  |
| V                  | Volt   |
| v/v                | Relação Volume Volume  |
| W                  | Watts  |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>   |    |
| <b>1.1 Gomas vegetais</b> .....   | 14 |
| <b>1.2 Galactomananas: Propriedades e aplicações biotecnológicas</b> .....  | 19 |
| <b>1.3 Uso de galactomananas como matrizes cromatográficas</b> .....  | 24 |
| <b>1.4 Galactomanana de algaroba (<i>Prosopis juliflora</i>)</b> .....  | 24 |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....  | 26 |
| <b>2.1 Objetivo geral</b> .....   | 26 |
| <b>2.2 Objetivos específicos</b> .....  | 26 |
| <b>3 MATERIAIS</b> .....  | 26 |
| <b>3.1 Vegetal</b> .....  | 26 |
| <b>3.2 Humano</b> .....   | 27 |
| <b>3.3 Reagentes</b> .....  | 27 |
| <b>4 MÉTODOS</b> .....  | 27 |
| <b>4.1 Processamento das vagens da algaroba para a obtenção das sementes</b> .....  | 27 |
| <b>4.2 Extração da galactomanana das sementes</b> .....   | 28 |
| <b>4.3 Caracterização físico-química da galactomanana</b> .....   | 28 |
| <b>4.4 Reticulação da galactomanana</b> .....   | 29 |
| <b>4.5 Montagem das colunas cromatográficas com a galactomanana reticulada</b> .....  | 29 |
| <b>4.6 Extração de proteínas das farinhas de sementes de <i>Artocarpus insisa</i>, <i>Artocarpus integrifolia</i>, <i>Ricinus communis</i> e <i>Abrus precatorius</i></b> ..... | 30 |
| <b>4.7 Dosagem de proteínas</b> .....   | 30 |
| <b>4.8 Avaliação da matriz reticulada de galactomanana na purificação das proteínas frutalina, jacalina, ricina e abrina</b> .....  | 30 |
| <b>4.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</b> .....   | 31 |
| <b>4.10 Atividade hemaglutinante</b> .....  | 31 |
| <b>5 RESULTADOS</b> .....   | 32 |
| <b>6 CONCLUSÃO</b> .....  | 42 |
| <b>7 REFERÊNCIAS</b> .....  | 43 |

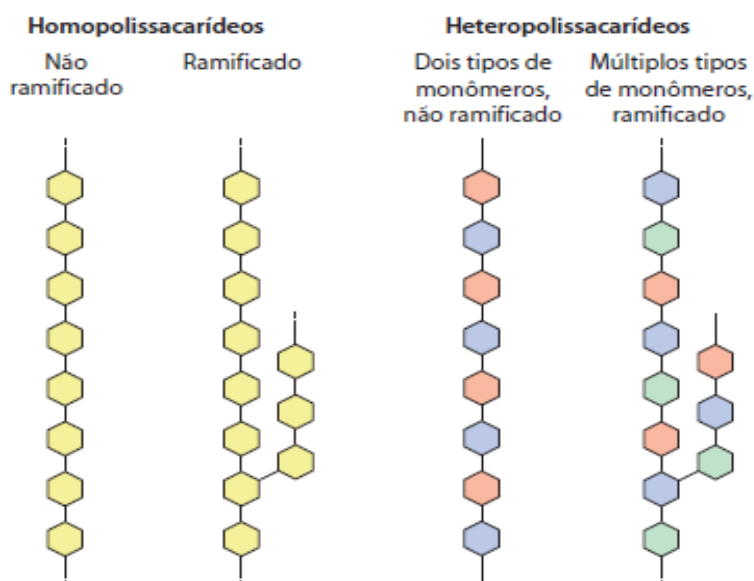
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Gomas Vegetais

Carboidratos são poli-hidroxi aldeídos ou poli-hidroxi cetonas, ou substâncias que geram esses compostos quando hidrolisadas. Muitos carboidratos tem a forma empírica  $(CH_2O)_n$ ; alguns também contêm nitrogênio, fósforo ou enxofre. Existem 3 classes principais de carboidratos: monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos (a palavra "sacarídeo" é derivada do grego *sakcharon*, que significa "açúcar") (NELSON e COX, 2014).

Os monossacarídeos são constituídos por uma única unidade poli-hidroxi cetona ou poli-hidroxi aldeído. Os oligossacarídeos consistem em cadeias curtas de unidades de monossacarídeos, ou resíduos, unidos por ligações características chamadas de ligações glicosídicas. Os polissacarídeos, também conhecidos como goma ou hidrocoloides são polímeros de açúcar que contêm mais de 20 unidades de monossacarídeos, sendo encontrados na natureza sob as mais diversas formas, e exercendo diferentes funções. Eles diferem uns dos outros na identidade das unidades de monossacarídeos repetidas, no comprimento das cadeias, nos tipos de ligações unindo as unidades e no grau de ramificação. A maioria dos carboidratos encontrados na natureza ocorre como polissacarídeos, polímeros de média a alta massa molecular ( $M_r > 20.000$  Da). Os polissacarídeos podem, ainda, ser classificados em homopolissacarídeos (quando contêm somente uma única espécie monomérica) e heteropolissacarídeos (quando contêm dois ou mais tipos de espécies monoméricas), como mostra a Figura 1 (ALVES, 2013; NELSON e COX, 2014).

Figura 1 – Estrutura de homo e heteropolissacarídeos



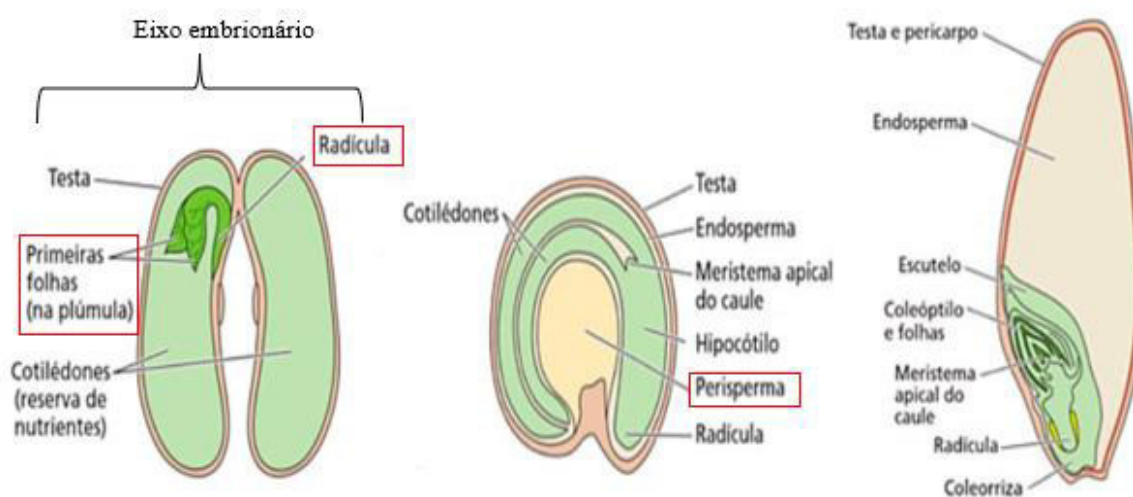
Fonte: Nelson e Cox (2014).

Nas plantas, os carboidratos são encontrados como constituintes estruturais (celulose, hemicelulose, pectina e outros polissacarídeos da parede celular); como reserva de energia (amido e inulina); constituintes de ácidos nucléicos, coenzimas e precursores de síntese de outros metabólitos (PAVARINI *et al.*, 2012; DURANTINI *et al.*, 2008).

As sementes são fontes de carboidratos, proteínas, lipídios e sais minerais que tem sido explorada por muito tempo pela indústria. Devido à abundância com que são encontradas na natureza e a facilidade de colheita, estes produtos naturais são candidatos importantes para exportação e investimentos científicos, pois possuem um amplo espectro de aplicações e não possuem toxicidade (DURANTINI *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2012). As quantidades relativas destes constituintes nas sementes são dependentes da espécie, fatores genéticos, climáticos, bem como da disposição de diferentes nutrientes disponíveis nos solos (GALLARDO, THOMPSON e BURSTIN, 2008).

Os compostos químicos de reserva das sementes podem estar presentes no eixo embrionário, no perisperma, ou até mesmo na combinação dessas partes, com destaque ao endosperma e cotilédones que são os principais órgãos com função de reserva na semente (GALLARDO, THOMPSON e BURSTIN, 2008; CORTE *et al.*, 2006). Na Figura 2 encontra-se a estrutura básica de uma semente onde se distingue os principais órgãos de reserva.

Figura 2 – Estrutura básica de uma semente dicotiledônea



Fonte: Adaptado de Taiz *et al.* (2017).

Os polissacarídeos de reserva podem ser acumulados no interior do protoplasto ou fazer parte da parede celular (FERREIRA e BORGHETTI, 2004; BENTO *et al.*, 2013). Os Polissacarídeos de Reserva de Parede Celular (PRPC) são relativamente inertes no que concerne



à sua reatividade química e apresentam diferentes graus de solubilidade em água (CUNHA *et al.*, 2009; BUCKERIDGE *et al.*, 2000).

Os PRPC são classificados em três grupos distintos: as mananas, as xiloglucanas e as (arabinos) galactanas. Esta classificação é baseada essencialmente na estrutura química desses polímeros, sendo as mananas subdivididos em mananas puras, glucomananas e galactomananas (Figura 3) (BUCKERIDGE *et al.*, 2000).

### ***1.1.1 Mananas e galactomananas***

As mananas puras são artificialmente definidas como contendo mais de 90% de manose, formando uma cadeia linear do tipo  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 sem ramificações, podendo ou não o restante estar ramificado com galactose (Figura 3B). Abaixo de 10% de ramificação, as mananas tornam-se insolúveis e precipitam rapidamente em solução aquosa (DEA *et al.*, 1986). Assim, as mananas são estruturalmente relacionadas às galactomananas, apenas apresentando um grau menor de ramificação com galactose. As mananas, portanto, apresentam alto grau de interatividade intermolecular, formando cristais na parede celular, o que confere dureza e diminui sua solubilidade (REID, 1985).

Já as galactomananas são polissacarídeos compostos por uma cadeia linear de resíduos de manose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), à qual resíduos de galactose estão unidos por ligações do tipo  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) (Figura 3B). As galactomananas ocorrem tipicamente em endosperma de sementes de leguminosas, mas elas também estão presentes em sementes de espécies de outras famílias como *Compositae* e *Convolvulaceae* (DEA e MORRISON, 1975; GUZMÁN e HERNANDEZ, 1982).

### ***1.1.2 Xiloglucanas***

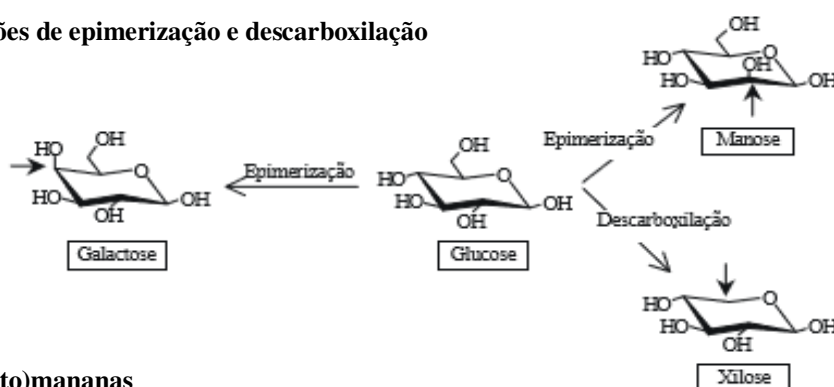
Xiloglucanas de sementes apresentam uma cadeia principal de  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-glucano ramificada com ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) por resíduos de D-xilopiranosídeos ou  $\beta$ -D-galactopiranosídeo-(1 $\rightarrow$ 2)-D-xilopiranosídeos (Figura 3C) (WHITE e RAO, 1953). Exceto pela ausência de terminais fucosil ligados [ $\alpha$ -L-(1 $\rightarrow$ 2)] nos grupos  $\beta$ -D-galactosídeos, existe uma grande semelhança entre xiloglucanas de reserva (em sementes) e xiloglucanas estruturais de paredes primárias, em tecidos vegetativos de dicotiledôneas (HAYASHI, 1989).

### ***1.1.3 Galactanas***

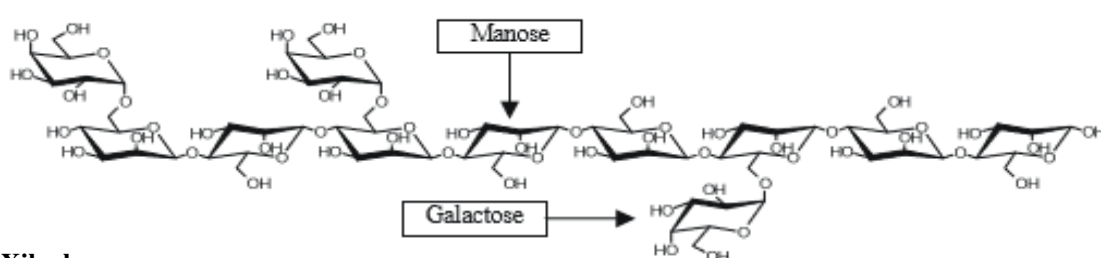
Em sementes, material contendo galactose foi detectado pela primeira vez em 1892 (SCHULZE e STEIGER, 1892). No entanto, a identificação de uma galactana como polissacarídeo distinto só foi conseguida em 1947 (HIRST *et al.*, 1947) em sementes de lupino (*Lupinus albus*). Com base na determinação estrutural, concluiu-se que o polissacarídeo era uma  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-galactana (Figura 3D).

Figura 3 - Estruturas químicas dos principais polissacarídeos de reserva de parede celular que ocorrem em sementes e os monossacarídeos que os constituem

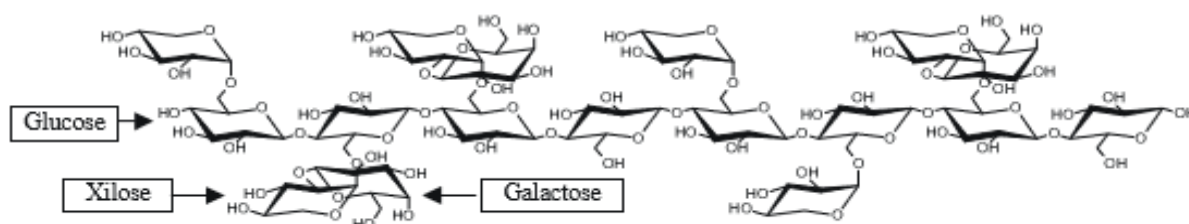
(A) Reações de epimerização e descarboxilação



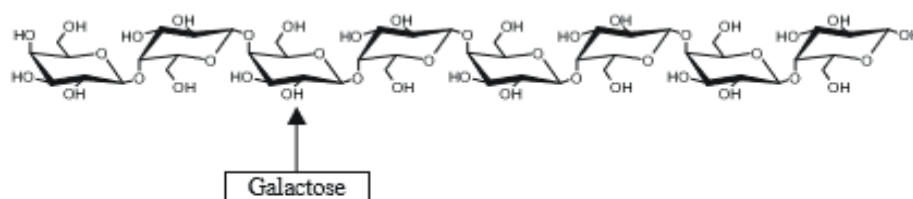
(B) (Galacto)mananas



(C) Xiloglucanas



(D) Galactanas



Fonte: Buckeridge *et al.* (2000). As setas em (A) indicam as posições dos carbonos que sofreram alterações (epimerização ou descarboxilação) a partir da glicose, dando origem aos outros monossacarídeos. Os PRPCs são classificados como (B) (galacto)mananas, (C) xilogluconas e (D) galactanas.

Dentre as principais substâncias armazenadas pelas plantas, muitos polímeros de carboidratos foram selecionados durante a evolução. Nas plantas superiores estes podem ser obtidos de exsudatos, sementes, frutos e tubérculos, como mostra a Tabela 1 (BUCKERIDGE *et al.*, 2000; CUNHA *et al.*, 2009).

Tabela 1 – Fontes usuais de alguns polissacarídeos vegetais

| Origem              | Polissacarídeo | Fonte                                 |
|---------------------|----------------|---------------------------------------|
| Exsudato de plantas | Goma arábica   | <i>Acacia spp</i>                     |
|                     | Tragacante     | <i>Astragalus spp</i>                 |
| Sementes            | Guar           | <i>Cyamopsis tetragonolobus</i>       |
|                     | Alfarroba      | <i>Ceratonia siliqua</i>              |
|                     | Tamarindo      | <i>T. indica</i>                      |
| Frutas              | Pectinas       | Maçãs e laranjas                      |
| Tubérculo, cereais  | Amido          | Milho, trigo, batatas                 |
|                     | Inulina        | Chicória, <i>Jerusalem artichokes</i> |

Fonte: Adaptado de Cunha *et al.* (2009).

## 1.2 Origem de polissacarídeos vegetais

### 1.2.1 Polissacarídeos de sementes

Os polissacarídeos de sementes podem ser divididos em de reservas ou estruturais. Os de reservas são os mais utilizados industrialmente. Dentre esses polissacarídeos incluem-se as galactomananas, xiloglucanas, glucanas e mananas, tendo as duas primeiras destaques em aplicações industriais. As espécies de maior utilização industrial, principalmente em alimentos, são as extraídas de *Cyamopsis tetragonolobus* (goma guar) e de *Ceratonia siliqua* (alfarroba). A proporção de manose (M) e galactose (G) nestes polissacarídeos é, respectivamente, ~1,7:1 e ~3:1. (STEPHEN *et al.*, 2006; EDWARDS *et al.*, 1989).

### 1.2.2 Exsudatos de plantas

Polissacarídeos de exsudatos são produzidos como mecanismo de defesa das plantas contra o estresse causado por injúrias físicas ou ataque microbiano. Esses polissacarídeos são heteropolissacarídeos complexos, ramificados e polidispersos. Estruturalmente, eles podem ser divididos em três grupos principais. O primeiro grupo é composto de uma cadeia principal de unidades de  $\beta$ -D-galactose ligada com cadeias laterais de  $\beta$ -D-galactose e ácido glucurônico. O segundo grupo possui uma cadeia principal de  $\beta$ -D-ácido glucurônico ligado à D-manose, com ramificações de arabinose e ácido glucurônico. O terceiro grupo consiste de uma cadeia de  $\alpha$ -D-ácido galacturônico ligado à  $\alpha$ -L-ramnose com ramificações de ácido glucurônico e  $\beta$ -D-galactose. Goma arábica (*Acacia* sp), Goma ghati (*Anogeissus latifolia*), tragacante (*Astragalus* sp) e caraia (*Sterculia urens*) são as gomas de exsudato comercialmente mais utilizadas (STEPHEN *et al.*, 2006).

### ***1.2.3 Polissacarídeos de frutas***

O principal polissacarídeo extraído da parede celular de frutas pertence à classe das pectinas. Elas são heteropolissacarídeos constituídos de uma cadeia principal linear de  $\alpha$ -D-ácido galacturônico e de seus derivados O-metilados. Na cadeia principal podem existir regiões onde a cadeia linear de ácido galacturônico é quebrada pela presença de resíduos de  $\alpha$ -L-ramnose. O ácido galacturônico geralmente está esterificado. O grau de esterificação e o número e a distribuição de resíduos de ramnose dependem da fonte da pectina e têm grande influência na solubilidade e na capacidade de formar gel (BEMILLER, 1986; AXELOS *et al.*, 1991).

### ***1.2.4 Tubérculos e cereais***

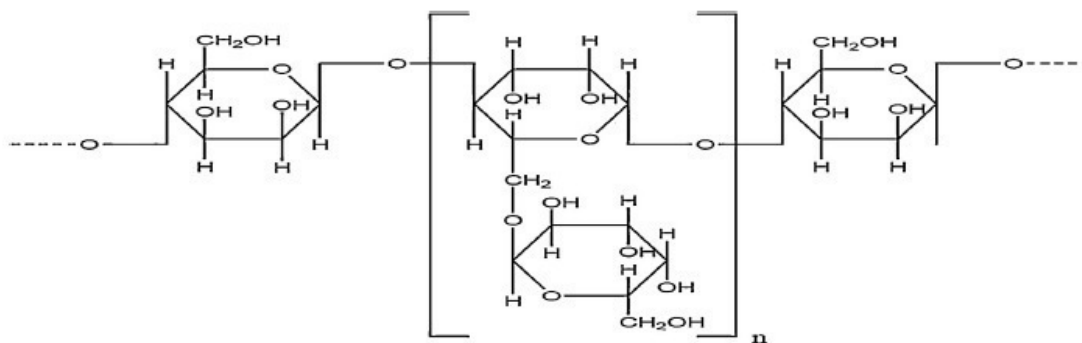
Amido é o polissacarídeo de reserva mais abundante nas plantas e mais utilizado como alimento. Inulina é uma frutana composta de  $\beta$ -D-frutose ligada com uma unidade de glucose no início da cadeia. Elas são muito abundantes na natureza e estão presentes tanto em plantas (tubérculos ou raízes) como em algumas bactérias. As plantas utilizadas na obtenção industrial são: chicória, alcachofra-girassol e dália (STEPHEN *et al.*, 2006).

## **1.2 Galactomananas: propriedades e aplicações biotecnológicas**

### ***1.2.1 Características***

As galactomananas são polissacarídeos heterogêneos compostos por uma cadeia linear de resíduos de manose unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, a qual resíduos de galactose são unidos por ligações do tipo  $\alpha$ -1,6, como mostra a figura 4 (CERQUEIRA *et al.*, 2011). Elas diferem uma da outra pela relação manose/galactose (M/G). Estas gomas são principalmente obtidas a partir do endosperma de sementes dicotiledóneas de diferentes plantas, particularmente das *Leguminosae*.

Figura 4 – Estrutura molecular geral de galactomananas



Fonte: Prajapati *et al.* (2013)

As composições químicas, ou seja, como os grupos galactosil são distribuídos ao longo da cadeia de manose, as conformações e as propriedades físicas e funcionais desses polissacarídeos podem variar significativamente com as fontes vegetais, os ambientes de plantio e o método de produção (KÖK, HILL e MITCHELL, 1999). A relação M/G varia consideravelmente dependendo da fonte de galactomanana e tipicamente varia entre 1,1 e 5,0 (SRIVASTAVA e KAPOOR, 2005). Variações na estrutura das galactomananas, particularmente na relação M/G e o posicionamento dos monossacarídeos na cadeia polimérica, causam mudanças significativas na solubilidade, viscosidade e nas interações entre galactomananas e outros polissacarídeos (PRAJAPATI *et al.*, 2013).

A razão molar de manose para galactose varia com a origem da planta, mas é tipicamente na faixa de 1,0: 1,0–1,1, 1,0: 1,6–1,8, 1,0: 3,0, e 1,0: 3,9 4,0 para as gomas de feno-grego, guar, tara e alfarroba, respectivamente. Considera-se que os grupos laterais de galactose perturbam estereoquimicamente a associação intercelular e a cristalização, conferindo desse modo certa solubilidade as galactomananas. Como resultado, a solubilidade das galactomananas aumenta com o grau de substituição de galactosil: o feno-grego e a goma de guar são prontamente dissolvidos em água fria, mas o aquecimento é necessário para solubilizar razoavelmente a goma de alfarroba na água (PRAJAPATI *et al.*, 2013).

O peso molecular médio da galactomanana está na faixa de 1 a  $2 \times 10^6$  Da (CERQUEIRA *et al.*, 2009). A galactomanana forma uma dispersão coloidal viscosa quando hidratada em água. (PRAJAPATI *et al.*, 2013). Apresentando diferentes propriedades físico-químicas, as galactomananas são um material versátil usado em muitas aplicações: são excelentes reforçadores e estabilizadores de emulsões, e a ausência de toxicidade permite seu uso nas indústrias têxtil, farmacêutica, biomédica, cosmética e alimentícia (BAVEJA *et al.*, 1991; KRISHNAIAH *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2007).

Portanto, pode-se concluir que as galactomananas são ricas em grupos hidroxila; isso permite que eles se liguem e absorvam água e sejam ricas em grupos cis-OH, permitindo a agregação de cadeia a cadeia via pontes de hidrogênio, de modo que a hidratação se torna mais complexa se a interligação cruzada ocorrer. Por substituição com galactose, a natureza estabelece impedimento estérico entre as moléculas e, assim, aumenta a solubilidade em água (PRAJAPATI *et al.*, 2013).

Segundo Mikkonen *et al.* (2007), os parâmetros mais importantes que definem o comportamento de uma galactomanana são a relação manose e galactose (M/ G), os graus de substituição e polimerização, o peso molecular médio, a conformação e a viscosidade intrínseca, pois tais características influenciam diretamente nas propriedades de filmes comestíveis. Revendo as aplicações técnicas, chama-se atenção para o comportamento químico das diferentes galactomananas. Existem aplicações que se beneficiam da excelente formação de viscosidade de alguns galactomananas ou de seus derivados e há também aplicações que se baseiam na absorção de água ou da formação de pontes de hidrogênio, bem como da formação de gel (CUI, ESKIN, BILIADERIS e MAZZA, 1995).

As três principais fontes de galactomanana de importância comercial na indústria alimentícia e não alimentícia são: a goma guar (GG, *C. tetragonolobo*), goma de tara (TG, *C. spinosa*,) e goma de alfarroba (LBG, *C. siliqua*) (DAKIA *et al.*, 2008). No entanto, as tendências da indústria exigem a introdução de fontes alternativas de gomas de semente e, portanto, é importante procurar por tais fontes renováveis alternativas (JOSHI e KAPOOR, 2003). Em algumas obras, as galactomananas têm sido usadas em misturas binárias com outros polissacarídeos, como goma xantana, ágar e k-carragenina, para formar géis com novas propriedades (VENDRUSCOLO *et al.*, 2005; BRESOLIN *et al.*, 1999; PINHEIRO *et al.*, 2011).

### **1.2.2 Possíveis aplicações**

Particularmente na indústria alimentícia, as principais aplicações das galactomananas são em produtos lácteos, géis de água à base de frutas, produtos em pó, panificação, produtos

dietéticos, branqueadores de café, formulações de leite infantil, temperos, molhos, sopas, carnes enlatadas, alimentos congelados e curados. Esta ampla gama de aplicações reflete um grande número de diferentes características funcionais, incluindo alta viscosidade da solução, estabilização de sistemas congelados e formação mista de gel com outros polissacarídeos e proteínas (PRAJAPATI *et al.*, 2013).

A grande vantagem das galactomananas é sua capacidade de formar soluções muito viscosas em concentrações relativamente baixas que são apenas levemente afetadas pelo pH, força iônica e processamento de calor (SITTIKIYOTHIN, TORRES e GONÇALVES, 2005). A viscosidade das galactomananas tende a permanecer constante em um amplo intervalo de pH (1 a 10,5), principalmente devido ao caráter neutro de suas moléculas, e também não se espera que suas propriedades mudem com a força iônica. No entanto, alguma degradação pode ocorrer sob condições altamente ácidas e alcalinas a altas temperaturas. A viscosidade e a estabilidade das soluções de galactomanana após o armazenamento dependem do tempo e da temperatura utilizados durante a preparação da solução formadora de filme. O aquecimento das galactomananas a temperaturas acima de 60 °C tende a fornecer uma alta viscosidade inicial, mas leva a uma estabilidade inferior (em termos de mudanças dependentes de tempo na viscosidade) (SRIVASTAVA e KAPOOR, 2005). As soluções de galactomanana geralmente exibem um comportamento não newtoniano, no qual a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento (GARTI *et al.*, 1997).

#### **1.2.2.1 Desenvolvimento de Viscosidade**

Algumas galactomananas, especialmente guar, mas também cassia e goma de alfarroba e seus derivados (aniônicos, catiônicos e não-iônicos) desenvolvem viscosidade muito alta em solução aquosa. Na indústria têxtil, eles são usados para engrossar os corantes na impressão e tingimento de fibras, tecidos e carpetes. As gomas controlam as características de fluxo das formulações de corantes, para que padrões nítidos e brilhantes possam ser alcançados. Para diferentes tipos de tecido e corante, diferentes tipos de espessantes são usados - principalmente em combinações. No campo dos explosivos, a goma de guar e os derivados são usados para espessar as soluções salinas de nitrato, que são os componentes básicos das formulações explosivas de lama, pois são composições mais seguras de usar. É bem conhecido que rachar e abrir as zonas portadoras de óleo ou gás com pressão hidráulica pode aumentar a produtividade de petróleo e gás. A solução de hidroxipropil-guar e outros derivados são usados neste processo que é conhecido como fraturamento hidráulico. Neste aspecto, outra propriedade das galactomananas também é vantajosa: a capacidade de gelificar elementos como boro ou metais de transição na

forma dos seus sais, que podem ser usados para bloquear ou apertar poços. Como essa reação gelatinosa é reversível com a mudança de pH, ela é usada para controlar a perda de fluido no poço (SITTIKIYOTHIN, TORRES e GONÇALVES, 2005).

#### **1.2.2.2 Formação de gel**

As galactomananas são capazes de formar géis com certos sais metálicos. Este efeito é utilizado no campo dos têxteis para imprimir tintas de cuba em duas fases, o que produz impressões brilhantes e nítidas. Tal propriedade também pode ser útil em aplicações técnicas, onde os géis são usados para suportar e ligar odores, como em purificadores de ar sólido. O transporte de pós sólidos, como carvão ou minérios suspensos em tais géis através de tubulações, também poderia ser possível, pois esses géis têm excelente força de suspensão (PRAJAPATI *et al.*, 2013).

#### **1.2.2.3 Formação de ligação de hidrogênio**

A fácil formação de ligações de hidrogênio é uma das características das galactomananas. Isso é amplamente utilizado na indústria de papel, onde o guar substituiu a alfarroba como aditivo final úmido (PRAJAPATI *et al.*, 2013).

Derivados carboximetilados de goma de cássia também mostram excelentes efeitos de ligação de hidrogênio, especialmente quando usados como aditivos e como agentes de colagem na fabricação de papel. Assim, os papéis leves podem ser produzidos com excelente estanqueidade, para que as tintas de impressão não possam passar. Na indústria de mineração, as galactomananas são usadas como agentes químicos de flotação, sendo adsorvidos em superfícies minerais hidratados. Na flotação, a galactomanana funciona como depressor para bloquear a adsorção de outros reagentes nas superfícies de talco e outras gangues, que são extraídas junto com os minerais valiosos (PRAJAPATI *et al.*, 2013).

#### **1.2.2.4 Absorção de água**

Para proteger os produtos sensíveis à água, estes podem ser pulverizados com galactomanana em pó e depois embalados. O guar seco é usado para cobrir substâncias para impedir que a água entre em cartuchos cheios de pós explosivos, cabos e assim por diante. Derivados de galactomanana reticuladas podem ser usados em competição com polímeros sintéticos como absorventes para artigos de higiene. (PRAJAPATI *et al.*, 2013)



As aplicações das galactomananas dependem da sua capacidade de formar pontes de hidrogênio com moléculas de água, uma propriedade que é contrária ao efeito estérico dos grupos laterais da galactose, que ajudam a alcançar uma maior solubilidade. Durante os últimos anos, muitas espécies de plantas foram investigadas quanto ao seu conteúdo de galactomanana para melhorar suas propriedades (viscosidade, estabilidade etc.) por modificação química e aumentar sua utilização (PRAJAPATI *et al.*, 2013).

### 1.3 Uso de galactomananas como matrizes cromatográficas

Cromatografia é uma técnica bastante utilizada para isolar e purificar moléculas. Dentre os tipos de cromatografia existentes, a cromatografia de afinidade baseia-se nas propriedades que certas moléculas possuem de se associarem seletivamente a moléculas específicas, frequentemente denominadas de ligantes. Uma característica das proteínas é sua habilidade em estabelecer ligações fortes, embora reversíveis, com seus ligantes. Assim, essa técnica torna possível o isolamento e purificação de moléculas baseada em suas propriedades biológicas (BRAGA *et al.*, 2011).

Dessa forma, proteínas galactose ligantes de *Abrus precatorius* e *Artocarpus integrifolia* foram isoladas e purificadas em matriz de afinidade a partir de guar comercial e de galactomananas de *Adenantha pavonina* e *Parkinsonia aculeata* (GARROS-ROSA *et al.*, 2006). Lectinas de *Artocarpus incisa*, *Ricinus communis*, *Abrus precatorius* e *Artocarpus integrifolia* também foram isoladas em matriz de galactomanana proveniente de *Caesalpinia pulcherrima* (BRAGA *et al.*, 2011). Também há relatos na literatura de uma matriz de goma de sementes de *Leucaena leucocephala* que foi igualmente preparada para o isolamento de proteínas galactose-específicas de *Trichosanthes anguina* (SESHAGIRIRAO, LEELAVATHI e SASIDHAR, 2005).

Sabendo-se que as características de polissacarídeos vegetais os tornam excelentes insumos para produção de matrizes cromatográficas de afinidade, fontes vegetais de galactomanana surgem como uma alternativa de baixo custo em relação as matrizes cromatográficas encontradas no mercado quando pretende-se isolar moléculas que se ligam reversivelmente a essa classe de biomoléculas.

### 1.4 Galactomanana de algaroba (*Prosopis juliflora*)

*Prosopis juliflora* é uma planta arbórea, xerófita, espinhosa, presente em solos rochosos e arenosos (VON MAYDELL, 1978), que pode ser encontrada desde o nível do mar até altitudes de

1500 m, em regiões com precipitação anual variando de 150 a 750 mm (GOOR e BARNEY, 1976; HUECK, 1972).

Essa espécie vegetal foi introduzida no Brasil em 1942, em Serra Talhada-PE, a partir de sementes procedentes de Piura, Peru (AZEVEDO, 1961; GOMES, 1961) para fins de suplementação alimentar do GADO (NOBRE, 1982). A dispersão de *P. juliflora* na caatinga ocorreu no ano de 1951, a partir de sementes de quatro plantas (AZEVEDO, 1982b), distribuídas para técnicos, produtores e prefeitos da região semiárida do nordeste brasileiro, para fomento da produção animal (AZEVEDO, 1961). Além da importância na alimentação animal, os frutos de *P. juliflora* se prestam para vários fins na alimentação humana, a partir da confecção de farinha, bolos, biscoitos, café, geleia, licor, cachaça, vinagre (AZEVEDO, 1982a; MENDES, 1987).

Sendo uma das maiores famílias no reino vegetal, Leguminosae ( $\approx 18.000$  espécies) tem o maior número de espécies estudadas até hoje quanto à presença de galactomananas. A razão manose/galactose e a distribuição dos resíduos de galactose ao longo da cadeia de manose variam de espécie para espécie, sendo importante para estudos quimiotaxonômicos e evolutivos (REID e MEIER, 1970; BUCKERIDGE e DIETRICH, 1990; BUCKERIDGE *et al.*, 1995b). As três subfamílias de Leguminosae (Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae) podem ser distinguidas utilizando-se este parâmetro.

Esta espécie vem sendo explorada para extração de polissacarídeo, muito comum encontrado no endosperma de suas sementes, a galactomanana, que possui uma ampla aplicação industrial devido conceder propriedades e características especiais, como estabilizante, alta viscosidade, agente emulsificante, espessante, geleificante e não possuir toxicidade ao ser humano (PINHEIRO *et al.*, 2010). Além disso esse polímero possui propriedades mecânicas que possibilitam sua aplicação na produção de fibras, filmes, adesivos, plásticos processáveis fundidos, espessantes, modificadores reológicos, hidrogéis, carreadores de drogas, emulsificantes, etc (TONZANI, 2012).

A goma da semente de *P. juliflora* foi isolada e suas porcentagens de proteína (0,60%), gordura (0,55%) e carboidrato total (98,46%), rotação específica (+64,01), viscosidade intrínseca (11,78 dL/g) e peso molecular calculado foram determinados. Esta goma revelou-se uma galactomanana com uma razão M/G de 1,74: 1, proporção próxima a de outras espécies relatadas na literatura, mostrando-se, assim, uma fonte alternativa de polissacarídeo promissor (RINCÓN *et al.*, 2014).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar a viabilidade técnica da purificação de proteínas galactose-ligantes utilizando matriz cromatográfica de afinidade de galactomanana de sementes de algaroba (*Prosopis juliflora*).

### 2.2 Específicos

- Estabelecer um protocolo eficiente de processamento das vagens de algaroba (*P. juliflora*) para obtenção de sementes;
- Estabelecer um protocolo eficiente de extração de galactomanana de sementes de vagens de algaroba (*P. juliflora*);
- Reticular a galactomanana de algaroba (*P. juliflora*) para obtenção de um hidrogel;
- Montar colunas cromatográficas com a galactomanana reticulada;
- Caracterizar via métodos físico-químicos as amostras de galactomanana pura;
- Extrair proteínas das farinhas de sementes de *Artocarpus incisa*, *Artocarpus integrifolia*, *Abrus precatorius* e *Ricinus communis*;
- Isolar e purificar proteínas galactose-ligantes de sementes de *A. incisa* (frutalina), *A. integrifolia* (jacalina), *A. precatorius* (abrina) e *R. communis* (ricina) utilizando a matriz de Gm de algaroba;
- Analisar as massas moleculares relativas das proteínas por SDS-PAGE;
- Avaliar a integridade funcional das proteínas purificadas por meio de atividade hemaglutinante;

Este documento não pode ser disponibilizado em sua versão integral no momento, pois encontra-se em processo de avaliação entre seus colaboradores para depósito de patente.