



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
MOLECULARES

**IMOBILIZAÇÃO DE LECTINAS EM REDE INTERPENETRADA À
BASE DE ÁLCOOL POLIVINÍLICO E POLIANILINA PARA A
CONSTRUÇÃO DE COLUNAS DE CROMATOGRAFIA DE
AFINIDADE**

CAROLINE REGO RODRIGUES

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Samantha Salomão Caramori

Anápolis-GO
2012

CAROLINE REGO RODRIGUES

**IMOBILIZAÇÃO DE LECTINAS EM REDE INTERPENETRADA À
BASE DE ÁLCOOL POLIVINÍLICO E POLIANILINA PARA A
CONSTRUÇÃO DE COLUNAS DE CROMATOGRAFIA DE
AFINIDADE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares na área de concentração de Química Orgânica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Samantha Salomão Caramori

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Kátia Flávia Fernandes.

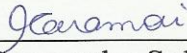
Anápolis-GO
2012

IMOBILIZAÇÃO DE LECTINAS EM REDE INTERPENETRADA À BASE
DE ÁLCOOL POLIVINÍLICO E POLIANILINA PARA A CONSTRUÇÃO
DE COLUNAS DE CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

CAROLINE RÊGO RODRIGUES

Dissertação apresentada ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Aprovada por:



Prof. Dra. Samantha Salomão Caramori (UEG)



Prof. Dr. Cirano José Ulhoa (UFG)



Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior (UFPE)

ANÁPOLIS, GO - BRASIL
AGOSTO 2012

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas contribuíram para a realização deste trabalho. Gostaria de agradecer a todos que, com boa-vontade e desprendimento, me ajudaram a entender um pouco mais da bioquímica que rege este mundo maravilhoso em que vivemos.

Agradeço à CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa; e à Universidade Estadual de Goiás que não só foi o berço da minha formação, mas que me deu a oportunidade de fazer parte do seu programa de pós-graduação. Aos membros da banca, por terem aceitado o convite de participar da avaliação deste trabalho. Aos laboratórios do Prof. Cirano, do Prof. Elson e, de forma especial, ao LQP, onde todo este trabalho foi desenvolvido.

Á minha orientadora Prof^{ta}. Samantha, a minha gratidão... pelas virtudes de responsabilidade e de esforço que me foram passadas. Agradeço também à Prof^{ta}. Kátia... uma grande pensadora, cujo sucesso em ensinar é proporcional ao poder de cativar pessoas.

Obrigada a todos!

*Na vida não vale tanto o que temos,
nem tanto importa o que somos,
vale o que realizamos,
com aquilo que possuímos
e acima de tudo
importa o que fazemos de nós!*

(Emmanuel)

RESUMO

A técnica de fabricação de colunas de cromatografia de afinidade utilizando lectinas tem exigido a elaboração de matrizes mais específicas, que resultem em sistemas com boa capacidade de imobilização e elevada atividade. Este trabalho objetiva propor um sistema suporte-lectina imobilizada que permita a separação de glicoproteínas, incluindo aplicações em cromatografia de afinidade. Uma rede interpenetrada de PVA e PANI foi sintetizada e ativada com GA, sendo que diferentes proporções destes reagentes foram testadas de acordo com um planejamento estatístico composto central 2². Em seguida, foram realizados testes para definir as condições ótimas de imobilização de duas lectinas diferentes: a fração parcialmente purificada de lectina de *Brosimum gaudichaudii* (Moraceae), uma planta de Cerrado conhecida por mama-cadela, que demonstrou ter alta concentração de lectinas nas sementes; e a concanavalina A (ConA), uma lectina comercial. O extrato bruto de mama-cadela foi obtido a partir da moagem das sementes e foi parcialmente purificado por uma sucessão de cromatografias de exclusão molecular e de bioafinidade. As proteínas das frações cromatográficas foram quantificadas e a atividade hemaglutinante foi determinada. Testes de caracterização, através de inibição por açúcares, mostraram que a lectina Brosimina apresenta seletividade para lactose e seletividade anomérica para β -galactose. Outros testes demonstraram que a lectina em questão não depende dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} e a presença de EDTA não afeta sua atividade. Ambas as lectinas foram imobilizadas com sucesso no mesmo suporte PVA-PANIG, porém, as condições ótimas de imobilização foram diferentes. A Brosimina apresentou os melhores resultados de atividade do suporte após o tempo de imobilização de 2 h com uma concentração de $240 \mu\text{g mL}^{-1}$ de lectina ofertada em pH 6,0; A ConA também apresentou os melhores resultados com tempo de imobilização de 2 h e com uma concentração de $240 \mu\text{g mL}^{-1}$ de lectina ofertada, porém o pH de imobilização ótimo foi 8,0. Este resultado demonstra que o suporte PVA-PANIG sintetizado é uma matriz promissora para a fabricação de colunas de bioafinidade com lectinas e uma opção no auxílio ao estudo dos glicoconjugados em geral.

Palavras-chave: Álcool polivinílico, polianilina, lectinas, imobilização, cromatografia.

ABSTRACT

The fabrication technique of affinity chromatography columns using lectins has required the development of more specific matrix, which results in a good immobilization capacity systems with high activity. This study aims to propose a lectin-immobilized carrier system allowing the separation of glycoproteins, including affinity chromatography applications. An interpenetrated network of PVA and PANI was synthesized and activated with GA, and different proportions were tested in accordance with a statistical design central compound 2². Then, tests were performed to define the optimal conditions for the immobilization of two different lectins individually: the partially purified fraction of *Brosimum gaudichaudii* (Moraceae) lectin, a Cerrado plant known as mama-cadela, which showed a high concentration of lectin in the seeds; and concanavalin A (ConA), a commercial lectin. The mama-cadela crude extract was obtained from the milling of seeds and was partially purified by a series of molecular exclusion and bioaffinity chromatography. The chromatographic fractions of proteins were quantified and hemagglutinating activity was determined. Characterization tests by inhibition of sugars, shows that the lectin has selectivity for lactose and β -galactose showing anomeric selectivity. Other tests demonstrated that the lectin in question does not depend on Ca^{2+} and Mn^{2+} ions and the presence of EDTA does not affect its activity. Both lectins were successfully immobilized in PVA-PANIG support, however, the optimal conditions of immobilization were different. The best immobilization results for Brosimina were obtained after 2 h with a concentration of $240 \mu\text{g mL}^{-1}$ offered lectin at pH 6.0; The ConA also showed the best results in 2 h with a concentration of $240 \mu\text{g mL}^{-1}$ lectin supplied, but the optimum pH was 8.0. This result shows that the PVA-PANIG support is promising for the manufacture of bioaffinity lectin columns and an option to the study of glycoconjugates in general.

Keywords: polyvinyl alcohol, polyaniline, lectins, immobilization chromatography.

LISTA DE ABREVIATURAS

ConA: Concanavalina A

EB: Extrato-Bruto

EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético

GA: Glutaraldeído

G50: Gel Sephadex G50

G75: Gel Sephadex G75

HPLC: do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

LAC: do inglês *Lectin Affinity Chromatography*

PANI: Polianilina

PVA: Álcool polivinílico (do inglês *Polyvinyl alcohol*)

PVA-PANI: Suporte para imobilização – rede interpenetrada de álcool polivinílico e polianilina

PVA-PANIG: Suporte para imobilização – rede interpenetrada de álcool polivinílico e polianilina ativada com glutaraldeído

PVA-PANIG-Brosimina: Suporte para imobilização – rede interpenetrada de álcool polivinílico e polianilina ativada com glutaraldeído com a lectina Brosimina imobilizada

PVA-PANIG-ConA: Suporte para imobilização – rede interpenetrada de álcool polivinílico e polianilina ativada com glutaraldeído com a lectina ConA imobilizada

SDS: Dodecil sulfato de sódio (do inglês *sodium dodecyl sulfate*)

UH: Unidade de Hemaglutinação

UV: Ultravioleta

UV/Vis: Ultravioleta/Visível

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Mama-cadela. A) Pseudofruto carnoso agregado com exsudação leitosa no pecíolo. B) Sementes lisas e opacas com cicatriz bem demarcada. C) Folhas simples e alternas. D) Face abaxial da folha com estípula axilar. Fonte: KUHLMANN, 2012..... 02
- Figura 2. Fluxograma de classificação dos métodos de imobilização segundo Caramori, Rodrigues, Fernandes (2011)..... 14
- Figura 3. Forma básica da polianilina. Fonte: SILVA, 2000..... 19
- Figura 4. Estrutura do PVA..... 21
- Figura 5. Cromatografia em coluna de gel Sephadex G-75. A linha em preto mostra as absorbâncias a 280 nm das frações obtidas da coluna Sephadex G75 em função do tempo. A linha vermelha mostra a atividade hemaglutinante destas frações. 46
- Figura 6. Cromatografia em coluna de gel Sephadex G-50..... 47
- Figura 7. Eletroforese (SDS-PAGE) de lectina de *Brosimum gaudichaudii* em Sephadex G-75 e G-50. Coluna 1: marcador molecular; Albumina Sérica Bovina (69 KDa), Ovalbumina (45 KDa), Quimiotripsinogênio (25 KDa) e Ribonuclease A (12,6 KDa). Coluna 2: EB. Coluna 3: pico 1 obtido da cromatografia em coluna Sephadex G-75. Coluna 4: pico obtido da cromatografia em coluna Sephadex G-50..... 48
- Figura 8. Perfil cromatográfico das frações (Sephadex G75) aplicadas em matriz de α -galactose (A) e β -galactose (B). O pico 1 corresponde a fração de proteínas não-ligadas eluídas com solução salina $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O pico 2, em B, corresponde a fração de lectinas retidas e eluídas com tampão glicina-HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,6. O volume vazio da coluna α -galactose foi de 6,0 mL e o da coluna de β -galactose foi de 4,0 mL 53
- Figura 9. Eletroforese (SDS-PAGE) de lectina de *Brosimum gaudichaudii* em Sephadex G-75. Coluna 1: marcador molecular; Albumina Sérica Bovina (69 KDa), Ovalbumina (45 KDa), Quimiotripsinogênio (25 KDa) e Ribonuclease A (12,6 KDa). Coluna 2: EB. Coluna 3: fração com atividade hemaglutinante do pico 2 obtido da cromatografia em coluna Sephadex G-75. Coluna 4: fração com atividade hemaglutinante do pico 2 obtido da cromatografia em coluna β -galactose 56
- Figura 10. Eletroforese em gel não-desnaturante de lectina de *Brosimum gaudichaudii*. Coluna 1: marcador molecular; Albumina Sérica Bovina (69 KDa), Ovalbumina (45 KDa), Quimiotripsinogênio (25 KDa) e Ribonuclease A

(12,6 KDa). Coluna 2: EB. Coluna 3: pico 1 obtido da cromatografia em coluna Sephadex G-75. Coluna 4: pico obtido da cromatografia em Sephadex G-50. Coluna 5: amostra eluída da coluna β -galactose..... 57

Figura 11. Rede interpenetrada PVA-PANIG. Demonstração esquemática da ligação entre as hidroxilas provenientes do PVA e as moléculas de GA; e a ligação entre o par de elétrons livres dos nitrogênios provenientes da PANI e outras moléculas de GA. As moléculas de GA funcionam como agentes de interligação entre o suporte e as lectinas imobilizadas. A lectina se liga à molécula de GA através de uma ligação covalente entre uma extremidade aldeídica e o grupo ϵ -amino da cadeia lateral de resíduos de lisina. 58

Figura 12. Superfície de resposta do planejamento composto central 2^2 relacionando a concentração de GA oferecida ao sistema de ativação e a quantidade de PVA do suporte em função da resposta em retenção de GA..... 61

Figura 13. Gráfico de Pareto da resposta de retenção de GA em função da quantidade de PVA e da concentração de GA utilizado na ativação. PVA(Q)= PVA Quadrático; PVA(L)= PVA Linear; glut(L)= Glutaraldeído Linear; 1Lby2L= interação entre o PVA linear e o glutaraldeído; glut(Q)= Glutaraldeído Quadrático 62

Figura 14. Superfície de resposta do planejamento composto central 2^2 relacionando o pH e o tempo de imobilização em função da retenção de lactose pelo sistema PVA-PANIG-Brosimina. 65

Figura 15. Gráfico de Pareto da resposta de retenção de lactose em função do pH e do tempo de imobilização. pH(L)= pH Linear; tempo(Q)= Tempo Quadrático; pH(Q)= pH Quadrático; tempo(L)= Tempo linear; 1Lby2L= interação entre o pH linear e o tempo linear. 66

Figura 16. Relação entre a concentração de proteínas oferecidas ao suporte PVA-PANIG e a resposta em porcentagem de retenção de lactose. 67

Figura 17. Superfície de resposta do planejamento composto central 2^2 relacionando o pH e o tempo de imobilização em função da retenção de glicose pelo sistema PVA-PANIG-ConA. 69

Figura 18. Gráfico de Pareto da resposta de retenção de glicose em função do pH e do tempo de imobilização. tempo(Q)= Tempo Quadrático; 1Lby2L= interação entre o pH linear e o tempo linear; pH(Q)= pH Quadrático; pH(L)= pH Linear; tempo(L)= Tempo linear. 70

Figura 19. Relação entre a concentração de ConA oferecida ao suporte PVA-PANIG e a resposta em porcentagem de retenção de glicose..... 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de funções dos polissacarídeos nos sistemas biológicos....	10
Tabela 2. Soluções utilizadas e tempo de exposição dos géis para coloração por nitrato de prata.....	31
Tabela 3. Síntese dos Suportes PVA-PANI com diferentes proporções de PVA.	33
Tabela 4. Planejamento composto central 2^2 da ativação de três tipos diferentes de PVA-PANI com três soluções de diferentes concentrações de GA.....	34
Tabela 5. Planejamento composto central 2^2 para determinação dos parâmetros de imobilização pH e tempo da lectina Brosimina fração G75 no suporte PVA-PANIG. Este teste foi conduzido em triplicata.	36
Tabela 6. Planejamento composto central 2^2 para determinação dos parâmetros de imobilização pH e tempo da lectina ConA no suporte PVA-PANIG.....	41
Tabela 7. Tabela de purificação das frações de EB, amostra eluída da coluna Sephadex G-75, da coluna Sephadex G-50 e da coluna β -galactose.....	55
Tabela 8. Planejamento composto central 2^2 da ativação de três tipos diferentes de PVA-PANI com três soluções de diferentes concentrações de GA*.....	60
Tabela 9. ANOVA. Análise de variância para retenção de GA nos suportes PVA-PANI.	60
Tabela 10. Planejamento composto central 2^2 da ativação de três tipos diferentes de PVA-PANIG-Brosimina com três níveis de variação de pH e tempo.	63
Tabela 11. ANOVA. Análise de variância para retenção de lactose nos suportes PVA-PANIG-Brosimina.	64
Tabela 12. Planejamento composto central 2^2 da ativação de três tipos diferentes de PVA-PANIG-ConA com variação de pH e tempo em três níveis.	68
Tabela 13. ANOVA. Análise de variância para retenção de glicose nos suportes PVA-PANIG-ConA.	69

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Brosimum gaudichaudii</i>	1
1.2. AS LECTINAS.....	3
1.3. OS CARBOIDRATOS	09
1.4. IMOBILIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS	13
1.4.1. Escolha do Suporte.....	16
1.4.2. A Polianilina.....	18
1.4.3. O Álcool Polivinílico.....	21
1.5. A CROMATOGRAFIA POR AFINIDADE POR LECTINAS	22
2. OBJETIVOS	24
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1. PURIFICAÇÃO PARCIAL DE LECTINA DE <i>Brosimum gaudichaudii</i>	25
3.1.1. Extração da lectina	25
3.1.2. Dosagem de proteínas.....	26
3.1.3. Teste de atividade hemaglutinante.....	26
3.1.4. Cromatografias por exclusão molecular	27
3.1.5. Cromatografias por bioafinidade	28
3.1.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE).....	29
3.1.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante	30
3.2. TESTE DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE POR AÇÚCAR	32

3.3. EFEITO DO ÁCIDO ETILENODIAMINOTETRACÉTICO (EDTA) E DOS ÍONS CÁLCIO (Ca^{2+}) E MANGANÊS (Mn^{2+}) NA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE.....	32
3.4. SÍNTESE DA MATRIZ DE PVA-PANI.....	33
3.5. ATIVAÇÃO COM GLUTARALDEÍDO (GA).....	33
3.6. IMOBILIZAÇÃO DE LECTINAS.....	35
3.6.1. Imobilização de Brosimina.....	36
3.6.1.1. Medida da atividade da Brosimina imobilizada	38
3.6.1.2. Determinação das condições ótimas de imobilização para a Brosimina.....	39
3.6.1.3. Determinação da capacidade de reutilização do sistema PVA-PANIG-Brosimina	39
3.6.2. Imobilização de ConA	40
3.6.2.1. Medida da atividade das proteínas ConA imobilizadas	42
3.6.2.2. Determinação das condições ótimas de imobilização para a ConA.....	43
3.6.2.3. Determinação da capacidade de reutilização do sistema PVA-PANIG-ConA	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. EXTRAÇÃO DA LECTINA BROSIMINA.....	45
4.2. CROMATOGRAFIAS POR EXCLUSÃO MOLECULAR.....	45
4.3. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURANTE.....	47
4.4. TESTE DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE POR AÇÚCARES.....	49
4.5. EFEITO DO ÁCIDO ETILENODIAMINOTETRACÉTICO E DOS ÍONS CÁLCIO E MANGANÊS NA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE	50
4.6. CROMATOGRAFIAS POR BIOAFINIDADE.....	51
4.7. TABELA DE PURIFICAÇÃO.....	55

4.8. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURANTE (SDS-PAGE).....	55
4.9. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NÃO DESNATURANTE.....	56
4.10. DETERMINAÇÃO DA PROPORÇÃO ÓTIMA PVA-PANIG.....	58
4.11. IMOBILIZAÇÃO DE LECTINAS.....	62
4.11.1. Imobilização de Brosimina.....	63
4.11.2. Imobilização de ConA.....	68
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
6. PERSPECTIVAS.....	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Brosimum gaudichaudii*

A família Moraceae é típica de regiões tropicais e é formada por 75 gêneros e 1550 espécies. No Brasil há cerca de 340 espécies, distribuídas em 28 gêneros, dos quais pode-se citar a jaqueira (*Artocarpus heterophyllus*), fruta-pão (*Artocarpus spp.*); figueira (*Ficus carica*), gameleira (*Ficus adhatodifolia*), mata-pau (*Ficus spp.*); amoreira (*Morus spp.*) e a mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii*) (MACHADO, 2007).

Brosimum gaudichaudii é um arbusto de pequeno porte encontrado na região de Cerrado do Centro-Oeste. A árvore pode atingir até 4 m de altura; possui ramos tortuosos e latescentes; folhas simples, alternas, de consistência firme, pecíolo curto e face inferior aveludada e nervuras principais amareladas na face superior. É uma espécie silvestre e frutifica de setembro a novembro (ALMEIDA, 1998). A planta é monóica e as flores são minúsculas, de coloração verde-amarelada, agrupadas na extremidade de pedúnculos pendentes das axilas das folhas; característica que ajuda a identificar a espécie.

Os frutos da mama-cadela são drupas, amarelo-alaranjados quando maduros e comestíveis; sua textura lembra goma de mascar devido à alta concentração de látex. O diâmetro de cada fruto pode chegar a 3 cm. O córtex da raiz é a parte da planta que apresenta maior concentração de cumarinas. O pó obtido da raspagem das raízes é utilizado como aromatizante (LOURENÇO, 2001; POZETTI, 2006). A Figura 1 mostra as características morfológicas da espécie.

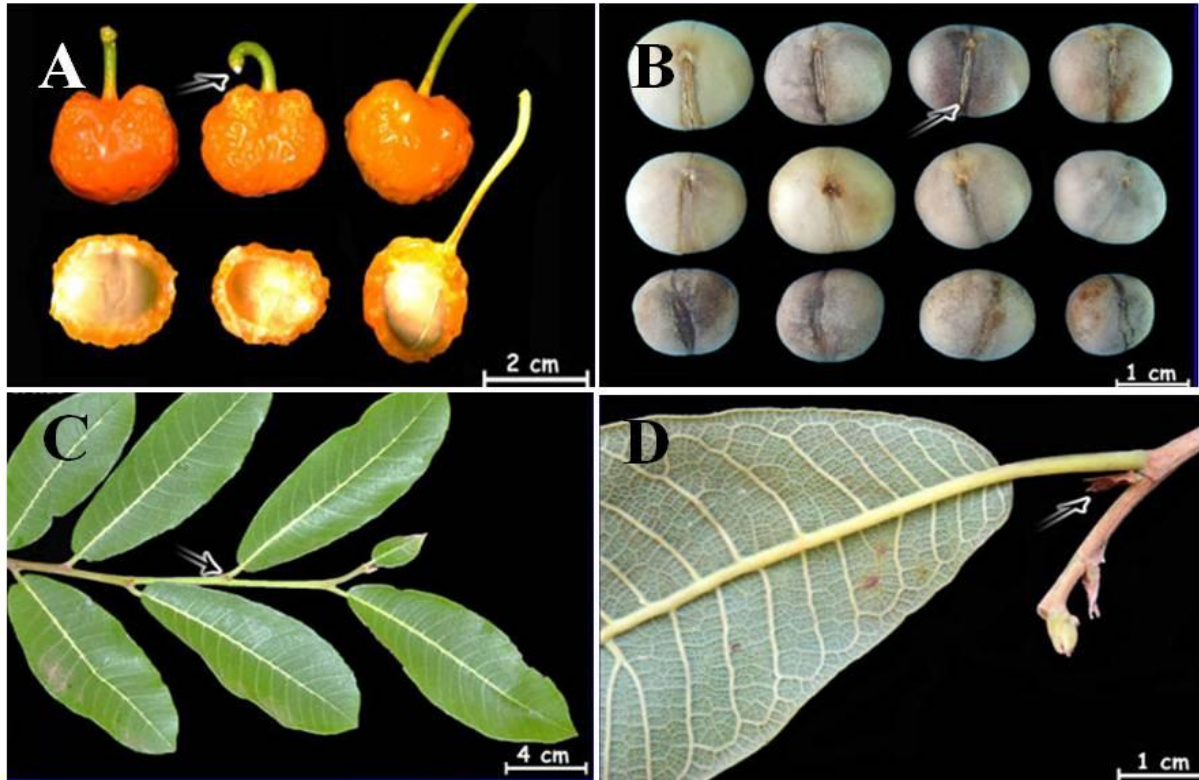


Figura 1. Mama-cadela. A) Pseudofruto carnoso agregado com exsudação leitosa no pecíolo. B) Sementes lisas e opacas com cicatriz bem demarcada. C) Folhas simples e alternas. D) Face abaxial da folha com estípula axilar. Fonte: KUHLMANN (2012).

As furocumarinas (NEVES et al., 2002), bergapteno e psoraleno encontradas nas cascas da raiz são utilizadas na forma de chá para o tratamento do vitiligo, pois possuem ação fotossensibilizante, aumentando a pigmentação da pele (VILEGAS; POZETTI, 1993). Também são encontrados na planta saponinas, taninos, protoantocianidinas e alcalóides apresentando atividade antigripal, antioxidante, cicatrizante, depurativa e estomáquica (NEVES et al., 2002). As atividades anti-helmíntica e antimicrobiana foram testadas por Pozetti (2006).

As plantas do Cerrado são largamente conhecidas como fonte de compostos de alto interesse biotecnológico e grande potencial econômico além de servirem como matérias-primas promissoras para fins nutricionais e medicinais. A partir de características biotecnológicas interessantes que as sementes de mama-cadela demonstraram, Machado (2007) conduziu a purificação parcial da lectina Brosimina. Ao longo do estudo foi demonstrado

que a lectina de mama-cadela tem alta capacidade de hemaglutinação lactose-específica. Dessa forma, utilizou-se o extrato de mama-cadela para a construção de um reator com a proteína imobilizada em polianilina com a finalidade de remoção da lactose do leite.

1.2. AS LECTINAS

As lectinas são proteínas (glicosiladas ou não), de origem não-imunológica que apresentam capacidade de se ligar reversivelmente a carboidratos específicos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

As lectinas são largamente distribuídas na natureza encontradas em vírus, micro-organismos, plantas, animais vertebrados, invertebrados; seja nas superfícies celulares ou em partículas intracelulares. As lectinas foram extraídas primeiramente de células animais, mas a capacidade de aglutinar eritrócitos foi descoberta em 1908, quando foram isoladas de sementes de leguminosas (SHARON; LIS, 1987).

Em 1888, Stillmark iniciou o estudo das lectinas. Ele atribuiu a toxicidade do extrato de mamona (*Ricinus communis*) a um fator hemaglutinante protéico (posteriormente chamado de ricina). Em 1908, Landsteiner e Raubitshek demonstraram que as lectinas vegetais são seletivas, ao identificar diferenças nas atividades hemaglutinantes de extratos de sementes distintos quando em contato com hemácias de espécies diversas (SELL; COSTA, 2000).

A primeira purificação de lectina vegetal foi realizada por Summer, em 1919, quando foi obtida a concanavalina A (*Canavalia ensiformis*) por precipitação salina e cristalização (SHARON; LIS, 1987). Este momento deu a base bioquímica para o salto posterior do estudo das lectinas: Renkonen (1948), Boyd e Requera (1949), Watkins e Morgan (1952); todos trabalharam no sentido de descrever a especificidade das lectinas para diferentes grupos sanguíneos.

Destes estudos surgiram os fundamentos necessários à caracterização dos grupos sanguíneos do sistema ABO (SELL; COSTA, 2000).

O termo lectina é derivado do latim *legere*, que significa “selecionado”. Este nome foi escolhido por Boyd e Shapleih, em 1954, pois reflete etimologicamente a propriedade dessas proteínas de aglutinar preferencialmente eritrócitos de determinados grupos sanguíneos. No entanto, concluiu-se mais tarde que essas proteínas têm capacidade de aglutinar também outros tipos de células, o que gerou o termo aglutininas (SELL; COSTA, 2000).

Agraw e Goldstein (1965) descreveram um método pioneiro de purificação de lectinas baseando-se em cromatografia de afinidade: para purificar a lectina concanavalina A (D-glicose específica), eles utilizaram uma coluna com Sephadex-Dextrano como fase estacionária. Após a aplicação da amostra na coluna eles recuperaram a concanavalina por eluição com solução de D-glicose.

O papel biológico das lectinas é identificar a informação pela ligação aos oligossacarídeos e disparar o mecanismo celular específico a esta sinalização (SELL; COSTA, 2000). As lectinas têm sítios de ligação capazes de interagir com diversos receptores de superfície celular. Esta ligação ativa um sistema de tradução das informações trocadas entre moléculas, células e organismos (MISQUITH; RANI; SUROLIA, 1994). Como exemplo pode-se citar o mecanismo de reconhecimento do óvulo pelo espermatozóide e a aderência de neutrófilos às células endoteliais dos vasos sanguíneos (ALBERTS et al., 2006). Além disso, alguns estudos mostram que as lectinas estão também envolvidas na proliferação, diferenciação e inibição celular por contato; morte celular e metástase, desenvolvimento de infecções e defesa imunológica, além do desenvolvimento de órgãos (LIS; SHARON, 1986; SHARON; LIS, 1989; HOLMSKOV et al., 1994; PULVERER; BEUTH; KO, 1994; MODY; JOSHI; CHANEY, 1995; FREEZE; SHARMA, 2010; NUNES et al., 2012a; NUNES et al., 2012b). Algumas lectinas encontradas em veneno de serpentes exercem

papéis na manutenção da hemostase e tem ajudado a elucidar mecanismos envolvidos na coagulação sanguínea e na ativação das plaquetas (ARLINGHAUS; EBLE, 2012).

As lectinas ou os carboidratos solúveis podem agir como pontes ligando-se às células opostas e à matriz extracelular (SHARON; LIS, 1989; MODY; JOSHI; CHANEY, 1995). A função das lectinas endógenas na interação célula-célula e célula-matriz é fundamental na proliferação, diferenciação e migração celular. O processo é mediado pelas interações entre as glicoproteínas de superfície celular, as moléculas de adesão e seus receptores (NUNES et al., 2012b). Heitzeneder et al. (2012) estudaram o impacto clínico da deficiência de uma lectina manana-específica em humanos. A deficiência de MBL, do inglês *Mannan-binding lectin*, é classificada como uma desordem de origem imunológica relativamente comum, pois afeta aproximadamente 30% da população do mundo. A MBL é parte do sistema imune inato; reconhece patógenos através da ligação a resíduos de carboidratos expressos pelos micro-organismos e ativa a cascata de complemento.

As lectinas são usadas como ferramentas não só para identificar grupos sanguíneos, mas para caracterizar micro-organismos, para estimular o crescimento de células imunes, para detectar e isolar carboidratos em solução ou em superfície celular (PULVERER; BEUTH; KO, 1995). As lectinas que induzem a mitose possuem a capacidade de aumentar a síntese de DNA e de causar a diferenciação de populações específicas de células. A ativação mitogênica de linfócitos, por exemplo, é policlonal e induz alterações morfológicas, modulação fenotípica dos determinantes de superfície e secreção de linfocinas ou imunoglobulinas (VOET; VOET; PRATT, 2002). A estimulação de leucócitos na presença das lectinas pode resultar na produção de diversas citocinas, como as interleucinas (IL-2, IL-3, IL-5, IL-6), GM-CSF (fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos) e INF- γ (interferon-

gama). A estimulação de células do baço com lectinas é utilizada como fonte de IL-2 (VOET; VOET; PRATT, 2002).

Apesar da classificação das lectinas ser baseada na especificidade por monossacarídeos, algumas lectinas podem mostrar diferenças na especificidade por oligossacarídeos. Portanto, lectinas pertencentes ao mesmo grupo genético se ligam aos mesmos carboidratos, mas quando extraídas de espécies vegetais distintas, mostram diferenças nestas ligações. Estas diferenças são bem menos acentuadas quando essas proteínas são extraídas de plantas do mesmo gênero (GOLDSTEIN; LIENER; SHARON, 1986).

Peumans e Van Damme (1995) dividiram as lectinas em três classes. As merolectinas possuem um único sítio ligante e por esta razão não apresentam a capacidade de aglutinar células. As hololectinas possuem dois ou mais sítios de ligação e tem afinidade por um único tipo de açúcar. A maioria das lectinas de plantas são hololectinas. As quimerolectinas têm sítios de ligação para carboidratos e outro sítio ativo com função diversa (podendo ter até função enzimática).

Geralmente as lectinas vegetais se apresentam com duas ou quatro subunidades. São constituídas de uma única cadeia polipeptídica como as de *Dioclea grandiflora*, *Cratylia floribunda*, mas também são conhecidas lectinas com subunidades compostas de duas cadeias polipeptídicas, como as lectinas da tribo Vicieae (*Pisum sativum*, *Lens culinaris*) (ALLEN; NEUBERGER, 1973; MOREIRA; OLIVEIRA, 1983; KONOZY et al., 2003). As lectinas vegetais triméricas são mais raras mas também já foram descritas (MULLER et al., 1983).

Com base na especificidade por monossacarídeos, as lectinas podem ser classificadas em cinco grupos: manose (Man), galactose (Gal)/N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglicosamina (GlcNAc), fucose (Fuc) e ácido N-acetilneuramínico-específicas (KALADAS et al., 1982). Certas lectinas demonstram especificidade anomérica, isto significa que elas se ligam

preferencialmente a glicosídeos alfa ou beta do mesmo monossacarídeo. Algumas delas exibem também especificidade a di, tri e tetrassacarídeos, com ligação até mil vezes mais forte que a ligação ao monossacarídeo correspondente (LIS; SHARON, 1998). Na maioria das vezes, o monossacarídeo ao qual a lectina tem afinidade se localiza na extremidade redutora, mas já foram descritas lectinas que reconhecem carboidratos situados no interior da cadeia (LIS; SHARON, 1998).

As lectinas reconhecem e se ligam reversivelmente a carboidratos específicos por ligações de hidrogênio, coordenação com metais, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas sem alterar a molécula de açúcar (SAFINA, 2012). Dois resíduos de aminoácidos na proteína se ligam ao metal e ao açúcar enquanto outra cadeia lateral da proteína forma ligações de hidrogênio com grupos hidroxila do carboidrato. Cátions divalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} estão envolvidos no reconhecimento do carboidrato agindo como uma ponte entre a proteína e a parte açúcar através de grupos hidroxil (SAFINA, 2012).

O EDTA é utilizado para se determinar a dependência da lectina por cátions divalentes. Esse ácido é um agente quelante que, por atração eletrostática, forma complexos com vários íons de modo que não há transferência de elétrons entre estes. Caso a atividade hemaglutinante da lectina dependa de metais, após ser dialisada com EDTA, há perda parcial ou total da atividade da lectina. Entretanto, a atividade pode ser restaurada pela adição dos íons ao meio (SAFINA, 2012).

Apesar do caráter hidrofílico dos carboidratos, causado pela presença de vários grupos hidroxil, as interações por ligações de hidrogênio não são maioria; pelo contrário, as interações hidrofóbicas tem papel mais importante na ligação lectina-carboidrato (SAFINA, 2012).

Lectinas são ferramentas muito úteis e explora-se em laboratório a sua capacidade de hemaglutinação (VOET; VOET; PRATT, 2002), especialmente na determinação de sua atividade nos extratos biológicos (SAMPAIO;

ROGERS; BARWELL, 1998; CARAMORI; LIMA; FERNANDES, 2004; CARAMORI; FERNANDES, 2009; ARAÚJO et al., 2012; ARLINGHAUS; EBLE, 2012; BERGSTROM et al., 2012; DARVILLE et al., 2012; MU et al., 2012; NUNES et al., 2012b) sua capacidade de monitorar a expressão dos carboidratos de superfícies celulares e na caracterização e purificação de glicoconjugados (como glicoproteínas e glicolipídios) (GOLDSTEIN; LIENER; SHARON, 1986).

A glicosilação desempenha um papel muito importante nas funções biológicas das células; desordens neste tipo de ligação afetam processos como crescimento de tumores, câncer, metástases, inflamações e desordens imunológicas e cardiovasculares. As lectinas são ferramentas úteis para caracterizar biomarcadores glicosilados (BERGSTROM et al., 2012).

Apesar de as lectinas estarem distribuídas em quase todos os seres vivos, elas são mais estudadas nos vegetais, embora o papel dessas proteínas nas plantas ainda não tenha sido completamente elucidado. Há indícios de que elas possam ter função como mediadores da simbiose entre plantas e microorganismos (DIAZ et al., 1989; LIMPENS; BISSELING, 2001), proteção contra patógenos (MISHKIND et al., 1982; SÁ et al., 2008), ativação de enzimas e que atuariam como proteínas de reserva (KESTWAL et al., 2007).

O papel da lectina de *M. urundeuva* (aroeira-do-sertão) na resistência à deterioração por agentes biológicos é discutido por SÁ et al. (2008). No Brasil, esta madeira é muito utilizada em construção civil, pois apresenta maior durabilidade e resistência ao ataque de térmitas (cupins). A resistência das plantas a insetos pode ser mediada por metabólitos primários (como lectinas) e secundários (como alcalóides e taninos), além disso, o impacto dos inseticidas inorgânicos sintéticos no meio ambiente têm estimulado a procura por compostos tóxicos para os térmitas que ocorrem na natureza. As lectinas são as proteínas de plantas supostamente mais envolvidas na atividade de proteção; elas demonstraram atividade tóxica em larvas de *Callosobruchus maculatus*

(MACEDO et al., 2004) e em moscas *Bactrocera cucurbitae* (KAUR et al., 2006) e sugere-se que essas proteínas possam ser exploradas como controle de pragas por engenharia genética aumentando a resistência das plantas aos insetos (SAHA et al., 2006).

Santana et al. (2012) demonstraram o isolamento de lectina de rizoma de *Microgramma vacciniifolia* e a determinação do potencial eletroquímico na presença de Ca^{2+} e Mg^{2+} e eritrócitos humanos tipo O. A atividade hemaglutinante dessa lectina foi neutralizada com EDTA sendo que a adição de Ca^{2+} e Mg^{2+} restaurou a atividade. O sistema eletroquímico demonstrou ser sensível a mudanças promovidas por esses íons e este efeito estimulatório na atividade hemaglutinante pode estar ligado a mudanças conformacionais na distribuição da carga na superfície da lectina.

A cada dia surgem novas frentes de estudo com foco nas propriedades das lectinas vegetais. Por esta razão a pesquisa de plantas com alto teor dessas proteínas aumentou muito nos últimos anos, principalmente no Brasil, onde são abundantes. O Cerrado brasileiro é um berço de biodiversidade e guarda potencial biotecnológico inimaginável. A planta *Brosimum gaudichaudii* faz parte deste grande leque de espécies de interesse científico e por ter alta concentração de lectinas em suas sementes é opção promissora para estudo de purificação.

1.3. OS CARBOIDRATOS

Os carboidratos são as moléculas mais abundantes na natureza e nas células estão presentes de muitas formas. Ocorrem em bactérias e fungos (dextranos e goma xantana), em algas (alginas, carragenanos, ágar-agar), em vegetais superiores (amido, celulose, gomas, mucilagens e pectinas) e em animais, em que a oxidação dos carboidratos constitui a principal via de produção de energia (Tabela 1). Carboidratos mais simples estão envolvidos no

reconhecimento e adesão celular enquanto polímeros mais complexos destas biomoléculas se ligam covalentemente a proteínas ou lipídios e agem como sinalizadores, chamados glicoconjugados (BRUNETON, 1993).

Tabela 1. Exemplos de funções dos polissacarídeos nos sistemas biológicos.

Função	Exemplos
Elemento estrutural	Celulose, Hemicelulose, Pectina
Polímeros de reserva	Amido, Frutanos, Mananos, Galactomananos, Xiloglicanos
Formadores de Hidrogéis	Mucilagens em vacúolos e paredes celulares
Estruturais e funcionais	Mucopolissacarídeos e Glicosaminoglicanos

Fonte: HANSEL; STICHER; STEINEGGER (1999).

Os polissacarídeos podem ser divididos em homogêneos ou homoglicanos, quando resultantes da condensação de muitas moléculas do mesmo açúcar e heterogêneos ou heteroglicanos, quando formados da condensação de diferentes tipos de açúcares, sendo as moléculas resultantes lineares ou ramificadas (NELSON; COX, 2011). A sequência das moléculas de açúcares pode ser periódica ou não e pode ter o grau de polimerização bastante variável de acordo com o número de monossacarídeos ligados. Poucos polissacarídeos têm menos de 100 monômeros, sendo que a maioria apresenta entre 200 a 3000 monômeros. Os polissacarídeos também podem ser classificados de acordo com sua solubilidade em água; entre os solúveis pode-se citar as gomas, mucilagens e pectinas e entre os insolúveis, os componentes da estrutura celular dos vegetais como a celulose e algumas hemiceluloses (SPILLER, 1994).

As características dos diferentes tipos de polissacarídeos são determinadas pela estrutura primária, tipo e sequência dos monossacarídeos, pelo grau de polimerização e pela conformação que, através da posição e do tipo de ligação, originam a distribuição espacial de suas cadeias. Assim conformações regulares produzem cadeias em hélice ou lineares, como é o caso de polissacarídeos com ligações (1→4) tipo amilose (α -(1→4)-D-glicopirranose), celulose (β -(1→4)-D-

glicopiranoose), pectinas (α -(1 \rightarrow 4)-galacturonopiranoose), alginas (α -(1 \rightarrow 4)-ácido L-glicurônico). Cadeias irregulares com ligações lineares α -(1 \rightarrow 4) e pontos de ramificação α -(1 \rightarrow 6) como na amilopectina conduzem a moléculas com conformações tipo árvore, espinha-de-peixe ou enovelados randômicos formando estruturas ramificadas que carregam mais informação biológica que ácidos nucleicos e proteínas de tamanho semelhante (NELSON; COX, 2011).

Dentre os principais tipos de polissacarídeos estão os dextranos, que são homopolímeros ramificados de glicose de alta massa molecular, elaborados por uma enzima exocelular (dextrana-sacarase) de diferentes bactérias dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*. Cerca de 90% das unidades de glicose encontram-se na cadeia linear principal formada por ligações α -(1 \rightarrow 4), enquanto as ramificações são formadas por ligações α -(1 \rightarrow 3), α -(1 \rightarrow 4) e α -(1 \rightarrow 2). Dispersões aquosas de dextranos são atóxicas e esses polissacarídeos são utilizados para fabricação de gel de preenchimento de colunas cromatográficas de exclusão molecular (HANSEL; STICHER; STEINEGGER, 1999).

Quando um ou vários oligossacarídeos se apresentam ligados covalentemente a proteínas, formam as glicoproteínas, que podem ser encontradas na face externa da membrana plasmática, na matriz extracelular e no sangue. Dentro das células, as glicoproteínas são encontradas em organelas específicas como o complexo de Golgi, grânulos de secreção e lisossomos. A porção oligossacarídica das glicoproteínas é rica em informações formando sítios de reconhecimento e de ligação de alta afinidade por outras proteínas (VOET; VOET; PRATT, 2002).

As glicoproteínas contém cadeias de monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos ou seus derivados (sulfo ou fosfosubstituídos), ligadas covalentemente, pelo seu carbono anomérico, à cadeia lateral polipeptídica. A porcentagem da massa de carboidrato nas glicoproteínas pode variar de 1% a 80% e os açúcares mais comuns são a glicose (Glc), galactose

(Gal), manose (Man), fucose (Fuc), N-acetilgalactosamina (GalNAc) e N-acetilglucosamina (GlcNAc) (SAFINA, 2012).

Algumas glicoproteínas tem uma única cadeia de oligossacarídeos, mas a maioria tem mais de uma (NELSON; COX, 2011). Em geral, as glicoproteínas podem apresentar oligossacarídeos (como na membrana plasmática), ou carboidratos de cadeias de tamanho maior, como nas proteoglicanas da matriz extracelular. No primeiro caso, a glicosilação pode ocorrer em apenas um ponto ou em múltiplos locais da estrutura protéica. Diferentemente, nas proteoglicanas ocorre a ligação de vários polissacarídeos a uma mesma proteína. A interação entre diversas proteoglicanas na matriz ajuda a proteger as membranas das células de danos mecânicos e químicos, além de absorver água e conferir às células uma superfície lubrificada, dando a elas maior mobilidade, alteração da polaridade e solubilidade das glicoproteínas, além da proteção contra algumas enzimas proteolíticas. Existem evidências de que esta camada também atue na estruturação da proteína, limitando a liberdade de conformação das cadeias polipeptídicas (ALBERTS et al., 2006). É conhecido ainda que a mesma proteína pode ter pontos de glicosilação diferentes dependendo do tecido onde é expressa, como por exemplo o TNF- β 1 que é diferente quando expresso nas células dos ovários de quando é expresso nas células das glândulas mamárias (VOET; VOET; PRATT, 2002).

A porção carboidrato das glicoproteínas está ligada à porção proteica por uma ligação glicosídica à hidroxila de um resíduo de serina ou treonina (O-ligada) ou por uma ligação N-glicosil a um nitrogênio amida de um resíduo de Asparagina (N-ligado) (NELSON; COX, 2011). Dois tipos de O-glicosilação são observados: a ligação de N-acetilgalactosamina a uma serina ou uma treonina; a ligação de um dissacarídeo de galactose ou de glicosil-galactose ao grupo hidroxil de uma hidroxilisina; ou ainda uma arabinose ligada ao grupo hidroxil de uma hidroxiprolina. A outra classe de ligações carboidrato-polipeptídeo é a N-glicosilação; neste caso uma N-acetilglucosamina é ligada à

extremidade N-terminal de um resíduo de asparagina. A asparagina deve estar cercada por uma sequência de aminoácidos X-Asn-X-Thr em que o X pode ser qualquer aminoácido; enquanto isso uma grande variedade de polissacarídeos pode ser ligada ao outro lado da N-acetilgalactosamina, como por exemplo, resíduos de manose (SAFINA, 2012).

Os carboidratos de superfície celular são os marcadores imunoquímicos que definem os tipos sanguíneos e ainda regulam o crescimento das células pela inibição por contato. Por isto são essenciais na comunicação intracelular e, juntamente com as lectinas, possuem atividade de reconhecimento e de adesão célula-célula (como as Selectinas) (VOET; VOET; PRATT, 2002).

1.4. IMOBILIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

O conceito mais utilizado de imobilização de proteínas foi definido por Chibata (1978), que afirma serem “macromoléculas que estão fisicamente confinadas, ou localizadas em uma região definida do espaço, com retenção de suas atividades, e que podem ser usadas repetidamente e continuamente”. Em 1916, Nelson e Griffin conduziram o primeiro procedimento de imobilização ao adsorver invertase em carvão ativado, e verificaram a manutenção da atividade desta enzima, mesmo após vários ciclos de utilização e lavagens (KENNEDY; WHITE, 1986). A partir daí vários métodos de imobilização foram desenvolvidos.

O uso de moléculas imobilizadas em suportes específicos tem várias vantagens sobre o uso dessas moléculas livres. A maior delas é a maior resistência a fatores desnaturantes como temperatura, pH e agentes químicos. O custo também é reduzido pela reutilização do sistema (KANG; KIM; KIM, 1997; AKSOY; TUMTURK; HASIRCI, 1998). Além disso, biomoléculas imobilizadas permitem a interrupção do curso da reação no momento desejado, fornecendo alternativas para a obtenção de novos produtos, aumentando a taxa

de conversão do processo, bem como o controle da qualidade. Essas vantagens nem sempre são obtidas com a biomolécula livre (AKSOY; TUMTURK; HASIRCI, 1998).

Para a escolha do suporte de imobilização é necessário o conhecimento sobre as características do método, suas vantagens e limitações em relação às outras opções existentes. Em relação à proteína que será imobilizada, deve-se ter conhecimento sobre a natureza química dos grupos reativos que poderão estar envolvidos, o custo e a estabilidade química e física dos reagentes, além das condições de micro-ambiente onde a proteína irá atuar. Logo, a escolha do método deve passar por uma análise conjunta dos aspectos científicos, de engenharia e econômicos no processo (KENNEDY; WHITE, 1986).

Os métodos de imobilização, segundo Kennedy e White (1986), são classificados combinando a natureza da interação responsável pela imobilização com a natureza do suporte utilizado. Dessa forma os métodos de imobilização podem ser para imobilizar proteínas solúveis ou insolúveis, como mostra a Figura 2.

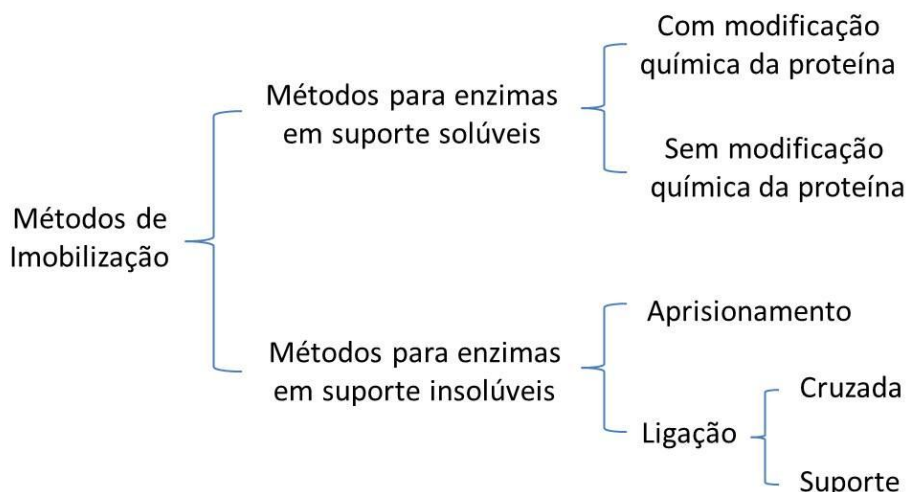


Figura 2. Fluxograma de classificação dos métodos de imobilização segundo Caramori, Rodrigues, Fernandes (2011).

Para as técnicas de imobilização para proteínas solúveis há formas de imobilização por ligação ou por aprisionamento (por gel, fibras ou microcápsulas). Recentemente foi publicado um trabalho que demonstra a imobilização de peroxidase e concanavalina A (PGP-ConA) por aprisionamento em gel de pectina. O complexo PGP-ConA teve boa eficácia e durabilidade e demonstrou que um sistema com enzimas imobilizadas pode ser usado eficientemente na remoção de corantes de efluentes industriais (JAMALA et al., 2012). Entretanto, dentre todos os exemplos citados, o método de imobilização através da ligação de proteínas a suportes insolúveis é o mais utilizado (SILVA, 2000).

A ligação entre as proteínas e os suportes insolúveis, nas imobilizações mais comuns, pode se dar por adsorção ou por ligação covalente. Na adsorção, o suporte interage com grupos de superfície da proteína, por atração eletrostática, força de van der Waals ou ainda por ligações de hidrogênio (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1995). A técnica consiste na mistura do suporte insolúvel à solução contendo as proteínas, sob condições apropriadas de pH, tempo e concentração de proteínas, seguida da separação do suporte contendo a proteína adsorvida do sobrenadante com as proteínas remanescentes não-ligadas (SILVA, 2000; FERNANDES et al., 2003). Neste caso, a eficiência do método dependerá de quão próximas estão as condições reais das condições ótimas de imobilização para uma determinada proteína em seu respectivo suporte. Assim sendo, após imobilização é necessário um cuidado especial para que as condições ótimas de imobilização sejam mantidas, caso contrário o sistema pode perder em eficiência e durabilidade (KENNEDY; WHITE, 1986).

A imobilização de proteínas pela formação de ligações covalentes entre um grupo ligante da proteína e o suporte insolúvel é o método de escolha quando se visa um sistema com maior durabilidade e quando a recuperação da proteína não é necessária. Este método emprega os mais variados tipos de ligação, sendo possível imobilizar proteínas através de qualquer um de seus

grupos superficiais reativos (HERNANDEZ; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011). Porém, os grupamentos químicos responsáveis pela atividade da proteína devem ser protegidos no momento da imobilização; isto significa que estes grupos não podem estar envolvidos na formação da ligação covalente, o que levaria a um sistema com proteínas imobilizadas desprovidas de atividade (SILVA, 2000).

As imobilizações por ligações covalentes necessitam de mais etapas de reação e mais tempo. No entanto, após imobilizadas, essas preparações apresentam grande estabilidade, de forma que somente reações muito drásticas no meio seriam capazes de ter influência na desestruturação do sistema (KENNEDY; WHITE, 1986).

Classificar os tipos de ligação das proteínas aos suportes separadamente pode dar a falsa impressão que em cada sistema só ocorre um tipo de ligação por vez. Isto não está inteiramente correto, pois no mesmo sistema podem coexistir vários tipos de ligações diferentes. Suportes com proteínas imobilizadas tanto por adsorção quanto por ligação covalente são relativamente comuns (ROCHA; GONÇALVES; TEIXEIRA, 2012).

1.4.1. Escolha do Suporte

Durante a escolha do suporte, deve-se pesquisar na literatura a estrutura química dos candidatos e a proposição do mecanismo de ligação. Esta ligação pode se dar por simples adsorção (reversível) ou por ligação cruzada iônica ou covalente, que na maioria dos casos é irreversível (KENNEDY; WHITE, 1986).

O conhecimento da natureza química dos grupos reativos que poderão estar envolvidos na reação de imobilização vão definir qual o suporte de melhor custo-benefício, a capacidade de regeneração deste e a estabilidade química e física dos reagentes (KENNEDY; WHITE, 1986).

Durante a imobilização podem ocorrer mudanças químicas e físicas na superfície da proteína. Em casos ideais estas mudanças devem gerar um caráter que minimize interações não-específicas com a amostra (MONZO; BONN; GUTTMAN, 2007).

A escolha do suporte para imobilização é, pois, o passo mais importante da técnica. Suportes orgânicos (agarose, celulose, quitina) oferecem grande versatilidade química, mas o fato de terem tempo de uso menor e maior suscetibilidade ao ataque de micro-organismos também deve ser considerado. Os suportes inorgânicos (por exemplo sílica ou vidro) oferecem a vantagem da possibilidade de variar características como tamanho do poro e forma das partículas e são mais utilizados em processos industriais. Suportes sintéticos como polianilina, poliestireno e polímeros de acrilamida também são opções como matrizes para imobilização (SILVA, 2000).

O suporte escolhido deve ser o que melhor se adeque ao micro-ambiente em questão. Ele deve favorecer a ligação do substrato (não pode se ligar à proteína pelo sítio ativo), inibir o crescimento bacteriano, ser estável, ser resistente a compactação e interferir o mínimo possível sobre a atividade da proteína (SILVA, 2000).

O micro-ambiente criado pelo suporte pode ter seu grau de hidrofiliicidade variando desde muito hidrofílico até totalmente hidrofóbico. Este parâmetro será definido de acordo com a capacidade da proteína de trabalhar em ambientes mais ou menos solvatados. É interessante notar que inicialmente a maioria dos sistemas utilizava suportes iônicos com maior grau de hidratação, pois acreditava-se que as proteínas imobilizadas mantinham melhor sua atividade nestes micro-ambientes. Mais tarde, matrizes hidrofóbicas foram ganhando espaço (HERNANDEZ; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011).

Outros fatores afetam a atividade de uma proteína imobilizada, principalmente porque o micro-ambiente onde a proteína se encontra pode ter características como pH e concentração de substrato totalmente diferentes do

resto da superfície do suporte onde não há biomoléculas imobilizadas. Isto decorre de fatores como o efeito de partição. Esse efeito é causa da atração ou repulsão do substrato, produto ou outras moléculas para perto ou para longe da proteína. Vale destacar que diversos grupos funcionais podem ser inseridos na superfície do suporte de acordo com a necessidade do método (TREVAN, 1980).

Suportes poliméricos sintéticos como poliestireno e polianilina e naturais como quitosana têm sido alvo de estudos de imobilização, assim como suportes a base de misturas, chamados compósitos. Pode-se definir compósito como um produto em que dois ou mais elementos são combinados em uma estrutura para obter vantagens e melhorias que nenhum dos componentes poderia fornecer isoladamente (BHATTACHARYA; DE, 1996).

Para facilitar e, em outros casos, permitir a ligação da proteína ao suporte, faz-se uso de reagentes bifuncionais, utilizados para tornar o suporte reativo ou para criar um braço espaçador entre a proteína e a superfície do suporte. Dentre os ligantes mais utilizados destacam-se as carbodiimidas, os agentes silanizantes e o glutaraldeído (WEETALL, 1975). Os ligantes devem permitir que a proteína imobilizada atue da forma mais parecida possível com aquela em solução (MONZO; BONN; GUTTMAN, 2007).

1.4.2. A Polianilina

A polianilina (PANI), cuja estrutura básica é mostrada na Figura 3, é um polímero de fórmula geral $(C_6H_7N)_x$ resultante da oxidação química ou eletroquímica da anilina, constituído de mais de mil unidades de PANI. É muito produzido no mundo devido à sua facilidade de síntese e boa estabilidade (TANG et al., 1988).

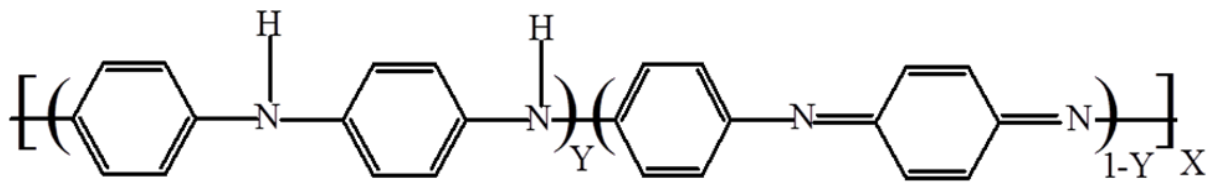


Figura 3. Forma básica da polianilina. Fonte: SILVA (2000).

A estrutura básica da PANI mostrada na Figura 3 pode mudar de acordo com o grau de oxidação e o grau de protonação do polímero. O estado de oxidação da polianilina pode ser variado gerando desde o polímero completamente reduzido ($Y=1$) até o polímero totalmente oxidado ($Y=0$) (FERNANDES et al., 2003). O menor estado de oxidação é definido pelo termo leucoesmeraldina; o estado de oxidação intermediário é chamado de esmeraldina e o termo pernigranilina refere-se a polímeros cujo estado de oxidação é alto (MACDIARMID; EPSTEIN, 1989).

Alterando-se o estado de oxidação ou o grau de protonação da PANI, é possível mudar e controlar as propriedades elétricas deste polímero. O átomo de nitrogênio imina de qualquer uma dessas espécies pode ser totalmente ou parcialmente protonado, dando origem aos sais correspondentes, sendo que o grau de protonação do polímero depende de seu estado de oxidação e do pH do ácido empregado no processo (MACDIARMID; EPSTEIN, 1989).

A PANI pode ser obtida por oxidação química ou eletroquímica, entretanto a oxidação química é mais utilizada para produção em larga escala, já que o produto da síntese não é limitado pela área dos eletrodos. Vários ácidos, como o ácido clorídrico ou o ácido sulfúrico têm sido usados juntamente com diversos agentes oxidantes, como o dicromato de potássio, o peróxido de hidrogênio ou o persulfato de amônio, na polimerização química da PANI (SOUSA et al., 2003). Dentre os agentes oxidantes, o mais utilizado é o persulfato de amônio, pois apresenta boa solubilidade em água, conduz a bons rendimentos e os produtos da sua redução são de fácil tratamento e baixa

toxicidade, uma vez que são gerados sais de metais leves e ácidos inorgânicos (STEJSKAL; GILBERT, 2002). Já a síntese eletroquímica se dá pela oxidação eletroquímica da anilina em meio ácido, sob a aplicação de corrente ou potencial elétrico (MACDIARMID; EPSTEIN, 1989).

As polianilinas têm excelente reciclabilidade redox e propriedades ópticas, elétricas e eletroquímicas, assim como alta estabilidade ambiental e facilidade de preparo. São polímeros de síntese barata e com alto rendimento. Essas características fazem da polianilina um bom candidato a suporte para imobilização de proteínas (SILVA, 2000). No entanto, apesar de todas as vantagens citadas, o uso de polianilinas quimicamente sintetizadas, como suportes para imobilização tem sido mais restrito, surgindo a necessidade de estudar melhor as características e propriedades deste polímero, bem como as suas aplicações como suporte para imobilização de proteínas.

Apesar das vantagens apresentadas, a PANI obtida por síntese química forma um pó fino de compactação difícil, devido à baixa velocidade de sedimentação. Somando-se a isso o fato de que a utilização de lectinas imobilizadas tem exigido a elaboração de matrizes mais específicas para esta finalidade, apesar da grande variedade de suportes disponíveis, tornou-se necessário combinar à polianilina uma substância que melhorasse sua utilização como matriz. Este novo material deve resultar em sistemas com alta capacidade de imobilização, elevada atividade e características adequadas ao uso (MONZO; BONN; GUTTMAN, 2007).

As mais recentes tecnologias requerem materiais com combinação de propriedades que não são encontradas naqueles convencionais. Materiais híbridos são preparados pela combinação de componentes com características diferentes e constituem uma alternativa para a produção de novos materiais multi-funcionais, com uma larga faixa de aplicações.

1.4.3. O Álcool Polivinílico

O álcool polivinílico (PVA, do inglês polyvinyl alcohol) é o polímero sintético hidrossolúvel mais produzido no mundo. Foi obtido pela primeira vez em 1924, por Herrman e Haehnel, pela hidrólise do poliacetato de vinila, que é a forma de obtenção comercial utilizada. Sua fórmula geral é $(C_2H_4O)_x$ (RAMARAJ, 2007).

O PVA tem grande potencial na utilização como matriz para imobilização por ser um polímero de boa plasticidade, cristalinidade e transparência. Tem alta resistência à tensão, é permeável, biodegradável e apresenta boa compatibilidade com compostos biológicos (CARAMORI; CARVALHO JR; FERNANDES, 2010). Este material vem sendo utilizado em associação com outros polímeros objetivando melhores propriedades mecânicas através da sua grande flexibilidade (IHM et al., 2002).

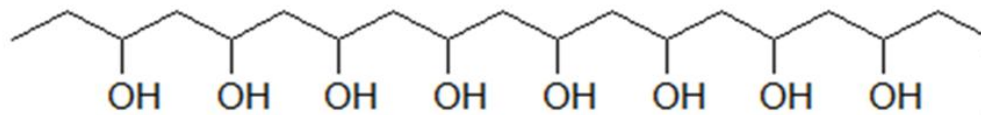


Figura 4. Estrutura do PVA.

Caramori et al. (2011) mostraram que a utilização de matrizes de imobilização de PVA-PANI (álcool polivinílico-polianilina) resultou em aumento da capacidade de imobilização em comparação a suportes exclusivos de PVA ou de PANI. Ao produzir uma matriz, para imobilização de lectinas, com melhor custo-benefício que as atualmente utilizadas, facilita-se o estudo de várias faces da bioquímica relacionadas a doenças com processos de desenvolvimento ainda não elucidados. Desta forma, as lectinas vêm sendo utilizadas na investigação científica como uma ferramenta útil na avaliação e no entendimento de diversos sistemas biológicos.

1.5. A CROMATOGRAFIA POR AFINIDADE POR LECTINAS

A capacidade de ligação das lectinas aos carboidratos torna possível a purificação de glicoconjugados (glicoproteínas, glicopeptídeos, glicolipídios e glicanas livres) utilizando a técnica de cromatografia por afinidade por lectinas – LAC (do inglês *lectin-affinity chromatography*). A técnica LAC é utilizada em todo o mundo por ser um método simples e eficiente para separação de misturas complexas de glicoconjugados com tamanhos e cargas similares, mas estruturas diferentes. Neste típico procedimento de separação, imobiliza-se a lectina em uma matriz específica e preenche-se a coluna desejada com a matriz ligada à lectina. Depois se injeta a solução amostra nesta coluna para que haja a seleção das glicanas de interesse e por fim as glicanas são eluídas da coluna, usando o equilíbrio reverso induzido pela adição de açúcares aos quais a lectina tem maior afinidade. Associada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), este método pode prover glicoconjugados altamente purificados para posterior análise estrutural (CUMMINGS, 1999).

Um procedimento baseado em cromatografia por afinidade por lectinas foi desenvolvido por Ribeiro, Catarino e Ferreira (2012). Partindo do princípio de que lectinas reconhecem oligossacarídeos relativamente complexos e ramificados, além de apenas simples moléculas de açúcares, o método desenvolvido foi apto a isolar membranas de eritrócitos.

As técnicas de cromatografia de afinidade evoluíram em eficiência. Como exemplo pode-se citar a Serial LAC (ENDO, 1996), em que colunas cromatográficas são acopladas uma após outra. A amostra passa de uma coluna para a outra e cada uma delas seleciona uma das moléculas de interesse. A técnica da Multi LAC (YANG; HANCOCK, 2004) se baseia na imobilização de várias lectinas diferentes na mesma coluna com o objetivo de selecionar várias

moléculas de interesse concomitantemente. A utilização de espectrômetro de massa acoplado ao HPLC preparativo é ferramenta útil na caracterização das moléculas eluídas.

A cromatografia por afinidade por lectinas tem extrema importância para os estudos de glicoconjugados e proteômica. A utilização correta da técnica de imobilização para a preparação do suporte é essencial para alcançar a reprodutibilidade e robustez do método. É esperado que este campo da cromatografia cresça ainda mais, inovando em tecnologia e diminuindo a complexidade e o tempo de criação e montagem dos suportes.

2. OBJETIVOS

Sintetizar uma matriz de PVA e PANI, utilizando o glutaraldeído como agente de interligação, capaz de imobilizar a lectina de *Brosimum gaudichaudii* parcialmente purificada e a lectina concanavalina A.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar os parâmetros ideais de imobilização para cada lectina individualmente: o tempo ideal para imobilizar a lectina no suporte, o pH ótimo de imobilização e a relação quantitativa lectina/suporte;
- b) Propor um sistema suporte-lectina imobilizada que permita a separação de glicoproteínas, incluindo aplicações em cromatografia de afinidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho se desenvolveu a partir de duas frentes de estudo concomitantes: a primeira se concentrou no desenvolvimento de um método cromatográfico para a purificação da lectina de *Brosimum gaudichaudii*, enquanto que a segunda produziu uma rede interpenetrada de PVA-PANI para imobilização de lectinas.

3.1. PURIFICAÇÃO PARCIAL DE LECTINA DE *Brosimum gaudichaudii*

A purificação parcial da lectina de *Brosimum gaudichaudii* foi conduzida pela obtenção do extrato bruto (EB) das sementes da planta e de técnicas cromatográficas de exclusão molecular e bioafinidade.

3.1.1. Extração da lectina

As sementes utilizadas para a fabricação da farinha de mama-cadela foram coletadas nos meses de outubro a novembro de 2009 no município de Jataí – GO (Fazenda do Campus da UFG de Jataí – 51°42'49,36"O). Após moagem, a farinha foi delipidada com hexano e mantida em capela até completa volatilização do solvente. Aproximadamente 24 h depois, a farinha foi armazenada em frascos hermeticamente fechados e mantida a 4 °C no Laboratório de Química de Proteínas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás.

A produção do extrato bruto foi feita na concentração de 0,1 g mL⁻¹ com solução glicina 0,1 mol L⁻¹ pH 9,0, sob agitação a 4 °C por 1 h. Posteriormente a farinha foi separada do EB por centrifugação durante 15 min a 4300,8 x g. Com o EB resultante foram feitos testes para determinar a quantidade de proteínas totais e atividade hemaglutinante.

3.1.2. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas totais foi feita de acordo com Bradford (1976). Adicionou-se 100 μL da amostra de EB a 5,0 mL do reagente de Bradford. Após 10 min em repouso à temperatura ambiente, a solução foi lida em espectrofotômetro UV/Vis (Bel Photonics 2000 UV, Brasil) em comprimento de onda de 595 nm e a concentração de proteínas do extrato foi calculada em relação à curva padrão do reagente, com leituras de concentrações crescentes entre 0,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina sérica bovina (BSA) com absorbâncias lineares a 595 nm e $r^2 = 0,99$.

3.1.3. Teste de atividade hemaglutinante

O teste de hemaglutinação se baseia na capacidade das lectinas em aglutinar hemácias. Seguindo o método de Moreira e Perrone (1977), utilizou-se suspensão de hemácias de sangue de coelho a 2% (v/v) em solução salina 0,15 mol L^{-1} pH 7,0. Em tubos de ensaio, a cada 100 μL de EB, foram adicionados 200 μL do sangue a 2%. A mistura foi levada ao banho-maria a 37 °C por 30 min. Posteriormente os tubos foram deixados em repouso à temperatura ambiente por iguais 30 min. A seguir, o material foi centrifugado a 67,2 x g por 1 min e a capacidade de aglutinação do EB foi detectada a partir da observação da formação de pequenos coágulos insolúveis. Foram feitas diluições seriadas na amostra para determinação do título em unidade de hemaglutinação (UH). Uma UH foi definida como sendo o inverso da maior diluição de uma dada solução que ainda é capaz de aglutinar uma suspensão de hemácias a 2 % (v/v) (MOREIRA; PERRONE, 1977).

3.1.4. Cromatografias por exclusão molecular

Para a separação das proteínas do extrato bruto inicialmente adotou-se o procedimento de montagem das colunas de vidro de dimensões 42,0 x 2,0 cm com filtros de poliamida. As fases estacionárias utilizadas foram os géis de dextrano Sephadex G-75 e Sephadex G-50 (Sigma, EUA). Ambos foram intumescidos com água destilada na proporção de 1:10 (p/v) por 1 h em temperatura ambiente. Foi utilizada uma quantidade de 7,0 g de gel por coluna.

O volume vazio das colunas foi calculado aplicando-se 1,0 mL de uma solução 1 mg mL⁻¹ do corante azul Blue Dextran (Sigma, EUA) às colunas de gel Sephadex. O volume eluído das colunas desde a aplicação do corante até sua total eluição em água foi considerado o volume vazio. As colunas foram então lavadas para posterior utilização.

O volume de 1,0 mL de EB foi aplicado à coluna de Sephadex G-75 previamente equilibrada com a fase móvel – glicina 0,1 mol L⁻¹ pH 9,0. O fluxo foi mantido em 0,5 mL min⁻¹ e as frações coletadas foram lidas em espectrofotômetro UV/Vis (Bel Photonics 2000 UV, Brasil) em comprimento de onda de 280 nm.

As frações referentes aos picos obtidos foram testadas quanto à presença de lectinas da mesma forma descrita para o EB (item 3.1.3). As frações cromatográficas que apresentaram aglutinação em sangue tiveram seus volumes medidos, reunidos e dialisados em quatro ciclos de troca de água destilada, com duração de 30 min cada, a 4 °C. Em seguida foram congelados em tubos de 50 mL, tipo *falcon*, liofilizados e o material resultante foi mantido em freezer a -10 °C.

Os liofilizados provenientes das cromatografias em coluna G-75 tiveram sua massa determinada e cada 10,0 mg destes foram ressuspensos em 1,0 mL de solução glicina 0,1 mol L⁻¹ pH 9,0. Este volume foi aplicado à coluna de

Sephadex G-50 e a cromatografia foi conduzida seguindo o mesmo método descrito para a coluna G-75.

3.1.5. Cromatografias por bioafinidade

Foram montadas colunas de dimensões 10,0 x 1,0 cm utilizando-se como fase estacionária gomas α -galactose e β -galactose, gentilmente cedidas pelo prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira (Universidade de Fortaleza/UNIFOR, Brasil). A goma de α -galactose é proveniente da planta conhecida por Carolina (*Adenantha pavonina* Beer, L.B. Smith) e a β -galactose do Jatobá (*Hymenaea courbaril* L.).

O volume vazio das colunas foi calculado aplicando-se 1,0 mL de uma solução 1 mg mL⁻¹ do corante azul Blue Dextran (Sigma, EUA) às colunas com gomas α e β . O volume eluído das colunas desde a aplicação do corante até sua total eluição em água foi considerado o volume vazio. As colunas foram então lavadas para utilização.

Cada 5,0 mg do liofilizado da coluna G-50 foram ressuspensos em 500 μ L de solução salina 0,15 mol L⁻¹ pH 7,0 e aplicados nas colunas previamente equilibradas com esta mesma solução a um fluxo de 0,5 mL min⁻¹. A fração de proteínas não-ligadas eluída com solução salina (solução de equilíbrio) teve absorvância detectada em espectrofotômetro UV/Vis (Bel Photonics 2000 UV, Brasil) em comprimento de onda de 280 nm até que esta leitura atingisse absorvância próxima de zero. Neste momento foi adicionada uma solução para eluição da fração de proteínas ligadas à fase estacionária (solução de eluição). Foram testadas cinco soluções para este fim: solução salina 1,0 mol L⁻¹ pH 7,0; solução de galactose 0,1 mol L⁻¹ e 0,2 mol L⁻¹, solução de lactose 0,1 mol L⁻¹ e tampão glicina-HCl 0,1 mol L⁻¹ em NaCl 0,1 mol L⁻¹ pH 2,6. A fração de proteínas eluídas teve sua absorvância detectada a 230 nm,

pois neste comprimento de onda são detectáveis também as ligações peptídicas (BIOCHEMICAL APPLICATIONS FOR UV/VIS SPECTROSCOPY, 2000).

As frações referentes aos picos obtidos foram testadas quanto à presença de proteínas e lectinas. Posteriormente, foi feita eletroforese em gel de acrilamida em condição não-desnaturante para o melhor acompanhamento da purificação da lectina pelas colunas.

3.1.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE)

As amostras liofilizadas provenientes das colunas G-75 e G-50 foram adicionadas ao tampão de amostra (tampão tris-HCl 100 mmol L⁻¹ pH 6,8; SDS 4% p/v; azul de bromofenol 0,2% p/v; glicerol 20% v/v e β-mercaptoetanol 10% v/v) na proporção de 1:1 e aquecidas até fervura por 5 min, assim como as proteínas marcadoras (LAEMMLI, 1970).

A eletroforese foi conduzida usando-se gel de aplicação de 5% (p/v) de acrilamida 30%/ bis-acrilamida 0,8% em tampão tris-HCl 1,0 mol L⁻¹ pH 6,8, SDS 10% (p/v), temed 99% (Nitrogen, EUA) e solução de persulfato de amônio 200 mg mL⁻¹; gel de separação 12% (p/v) de acrilamida 30%/ bis-acrilamida 0,8% em tampão tris-HCl 1,0 mol L⁻¹ pH 8,8, SDS 10% (p/v), temed 99% e solução de persulfato de amônio 200 mg mL⁻¹.

A quantidade de amostra aplicada foi de 20 µL por poço do gel, aproximadamente 20 µg de proteína. A amperagem foi fixada em 40 mA. Após o término da corrida, o gel foi tratado com solução corante contendo metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e 0,1% (p/v) de azul brilhante de Comassie. Em seguida, o gel foi colocado em uma solução descorante reveladora contendo metanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v). A mobilidade eletroforética de uma proteína em um gel de poliacrilamida é inversamente proporcional ao seu peso molecular. Com base nesta característica, a massa molecular das bandas foi

determinado por um gráfico de log das massas das proteínas marcadoras contra a migração das bandas desconhecidas (NELSON; COX, 2011).

3.1.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante

As amostras liofilizadas provenientes das colunas G-75, G-50 e β -galactose foram adicionadas ao tampão de amostra (glicerol 50% v/v; solução tris-HCl 1,0 mol L⁻¹ pH 6,0, azul de bromofenol 1% p/v e água destilada) na proporção de 1:1, assim como as proteínas marcadoras.

A eletroforese foi conduzida usando-se gel de aplicação de 3,0% (p/v) de acrilamida 30%/bis-acrilamida 0,8% em tampão tris-HCl 1,0 mol L⁻¹ pH 6,8, temed 99% (Nitrogen, EUA) e solução de persulfato de amônio 200 mg mL⁻¹; gel de separação 7,5% (p/v) de acrilamida 30%/bis-acrilamida 0,8% em tampão tris-HCl 1,0 mol L⁻¹ pH 8,8, temed 99% e solução de persulfato de amônio 200 mg mL⁻¹.

A quantidade de amostra aplicada foi de 20 μ L por poço do gel, aproximadamente 20 μ g de proteína. A amperagem foi fixada em 35 mA. Após o término da corrida, o gel foi tratado com solução corante contendo nitrato de prata como mostra o protocolo da Tabela 2.

Tabela 2. Soluções utilizadas e tempo de exposição dos géis para coloração por nitrato de prata.

Coloração do Gel por Nitrato de Prata		
1	Em agitação por 1 h	Solução Fixadora: Metanol 50% (v/v) Ácido Acético 12% (v/v) Formaldeído 0,5 mL L ⁻¹
2	Lavar 3x 20 min	Etanol 50% (v/v)
3	Pré-tratamento por 1 min	Tiosulfato de Sódio 0,2 g L ⁻¹
4	Enxaguar 3x 20 s	Água destilada
5	Impregnar por 20 min	Solução Nitrato de Prata: Nitrato de Prata 2 g L ⁻¹ Formaldeído 0,75 mL L ⁻¹
6	Enxaguar 3x 20 s	Água destilada
7	Agitar até as bandas aparecerem	Solução Reveladora: Carbonato de Sódio 0,06 g mL ⁻¹ Formaldeído 0,5 mL L ⁻¹ Tiosulfato de Sódio 0,2 g L ⁻¹
8	Enxaguar 3x 20 s	Água destilada
9	Enxaguar	Solução de Parada: Metanol 50% (v/v) Ácido Acético 12% (v/v)
10	Enxaguar	Metanol 50% (v/v)

3.2. *TESTE DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE POR AÇÚCAR*

Foram preparadas soluções partindo da concentração de $2,5 \text{ mol L}^{-1}$ até soluções de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, sacarose e xilose. Em tubos de ensaio distintos foram adicionados $100 \mu\text{L}$ das respectivas soluções e $100 \mu\text{L}$ da fração purificada de Brosimina contendo 2 UH. Esses tubos foram levados a banho-maria a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min e depois deixados em repouso até alcançarem temperatura ambiente. A cada tubo, foram adicionados $200 \mu\text{L}$ de suspensão de hemácias de coelho a 2% (v/v) (MOREIRA; PERRONE, 1977) e os tubos foram novamente levados a banho-maria a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min.

Após alcançarem a temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados por 5 min a $67,2 \times g$. Os resultados quanto à aglutinação ou não-aglutinação do sangue foram observados a olho nu e a especificidade da lectina foi determinada comparando-se as menores concentrações dos diferentes açúcares capazes de inibir completamente a atividade hemaglutinante.

3.3. *EFEITO DO ÁCIDO ETILENODIAMINOTETRACÉTICO (EDTA) E DOS ÍONS CÁLCIO (Ca^{2+}) E MANGANÊS (Mn^{2+}) NA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE*

A fração de Brosimina purificada da coluna β -galactose foi dialisada contra $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de EDTA por 24 h, seguida por diálise contra solução salina $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ por iguais 24 h. A solução de Brosimina na concentração 2 UH teve sua atividade hemaglutinante testada antes e depois da diálise. Da mesma forma, a solução de Brosimina dialisada teve sua atividade medida antes e depois da adição de CaCl_2 e MnCl_2 ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$) ao meio reacional.

3.4. SÍNTESE DA MATRIZ DE PVA-PANI

A síntese das matrizes PVA-PANI foi realizada de acordo com os métodos de Anthonysamy et al. (1996) e de Caramori, Carvalho Jr. e Fernandes (2010), com algumas modificações. Diferentes quantidades de PVA (Vetec Química Fina, Brasil) triturado foram adicionadas a volumes constantes de anilina previamente destilada (Merck, Alemanha), conforme Tabela 3. Após a homogeneização dessa mistura, foi adicionada uma solução de persulfato de amônio (Quimex, Brasil) na concentração $0,61 \text{ mol L}^{-1}$ em HCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$. A mistura foi levada à mufla a $250 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 h. Os polímeros resultantes foram triturados em gral de porcelana e peneirados em peneira de análise granulométrica inox de tamanho $500 \text{ }\mu\text{m}$ sendo gerado pó finíssimo que foi então armazenado à temperatura ambiente em recipientes de polipropileno hermeticamente fechados.

Tabela 3. Síntese dos Suportes PVA-PANI com diferentes proporções de PVA.

	PVA triturado (g)	Anilina destilada (mL)	Persulfato de amônio (mL)
Suporte 1	5,0	10,0	10,0
Suporte 2	5,0	10,0	10,0
Suporte 3	5,0	10,0	10,0
Suporte 4	10,0	10,0	10,0
Suporte 5	10,0	10,0	10,0
Suporte 6	10,0	10,0	10,0
Suporte 7	15,0	10,0	10,0
Suporte 8	15,0	10,0	10,0
Suporte 9	15,0	10,0	10,0

3.5. ATIVAÇÃO COM GLUTARALDEÍDO (GA)

A ativação das matrizes foi realizada baseada em Silva (2000) com modificações. Para analisar o efeito combinado das variáveis independentes na

capacidade de retenção de GA nos suportes PVA-PANI, optou-se pela metodologia de superfície de resposta com delineamento experimental com ponto central. Este tipo de delineamento foi definido a partir de resultados preliminares dos testes e foi utilizado em todo o estudo. Os parâmetros foram estabelecidos como variáveis independentes e foram estudados em três níveis (-), (0) e (+). Desta forma foi feito um planejamento composto central 2^2 em que a quantidade de PVA dos materiais e a concentração das soluções de GA utilizadas na ativação foram variadas, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Planejamento composto central 2^2 da ativação de três tipos diferentes de PVA-PANI com três soluções de diferentes concentrações de GA.

Experimento	Quantidade de PVA (g) do suporte PVA-PANI	Solução de GA (%) utilizada na ativação
1	0,5 (-)	1,0 (-)
2	0,5 (-)	2,5 (0)
3	0,5 (-)	4,0 (+)
4	1,0 (0)	1,0 (-)
5	1,0 (0)	2,5 (0)
6	1,0 (0)	2,5 (0)
7	1,0 (0)	4,0 (+)
8	1,5 (+)	1,0 (-)
9	1,5 (+)	2,5 (0)
10	1,5 (+)	4,0 (+)

A cada 10 mg das matrizes de PVA-PANI produzidas, foi adicionado 1,0 mL da solução de glutaraldeído (GA) e as suspensões foram mantidas em agitação leve por 1 h a temperatura ambiente. Após a ativação, os suportes ativados foram centrifugados por 5 min (3360 x g) e lavados exaustivamente com solução tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 até que a absorbância a 310 nm da solução de lavagem se aproximasse de zero.

A quantidade de GA ligada aos suportes foi medida pela diferença entre a concentração da solução inicial de GA antes da ativação e a concentração do sobrenadante com GA remanescente. Para isto foi utilizado método de detecção

colorimétrico de Boratynski e Zal (1990) com modificações. Em tubos de ensaio foram adicionados 300 μL da amostra de GA na concentração 10% (v/v) e 40 μL de fenol em etanol 4% (v/v). Em seguida, foram lentamente adicionados 100 μL de H_2SO_4 96% (v/v) e posteriormente 200 μL de água destilada. Após os tubos atingirem temperatura ambiente, as soluções foram lidas em espectrofotômetro UV (Bel Photonics UV, Brasil) a 482 nm. Utilizando este método, foi feita uma curva de calibração de 0,5% a 5,0% de GA em solução.

A partir das leituras dos sobrenadantes, foi calculada a porcentagem de GA que ficou retida ao suporte em cada material. Com o objetivo de definir qual suporte e qual solução de GA teve o maior efeito de retenção de GA, foi feito o tratamento estatístico dos dados, utilizando o programa Statistica 6.0 (Statistica 6.0 Stat Soft Inc, Tulsa).

3.6. IMOBILIZAÇÃO DE LECTINAS

O material PVA-PANIG que apresenta maior capacidade de retenção de GA foi utilizado para os testes de imobilização de lectinas. Um planejamento composto central 2^2 variando os parâmetros de tempo e pH foi delineado para os testes de imobilização das lectinas e posteriormente foram feitos testes no intuito de determinar a razão ótima entre a concentração de lectina ofertada e a quantidade de suporte utilizada. Primeiramente foi imobilizada a fração eluída da coluna Sephadex G75 proveniente do EB das sementes de *Brosimum gaudichaudii*, que contenha a lectina Brosimina. Em seguida, foi imobilizada a proteína Concanavalina A (ConA) (Sigma Aldrich, EUA). A imobilização dessas lectinas se desenvolveu em tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ garantindo-se assim o tamponamento nos valores de pH pré-determinados. Desta forma foram determinadas as condições ótimas de imobilização das lectinas Brosimina e ConA no suporte PVA-PANIG com maior capacidade de retenção de GA.

3.6.1. Imobilização de Brosimina

A cada 10 mg do suporte PVA-PANIG, em tubos tipo *Eppendorf*, foi adicionado 1,0 mL de solução de Brosimina fração G75 na concentração de 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$ acrescida de lactose a 5,0 mmol L^{-1} , a fim de prevenir a imobilização das lectinas pelo sítio de ligação aos carboidratos. As soluções foram imobilizadas em diferentes pH, de acordo com o planejamento estatístico composto central 2^2 descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Planejamento composto central 2^2 para determinação dos parâmetros de imobilização pH e tempo da lectina Brosimina fração G75 no suporte PVA-PANIG. Este teste foi conduzido em triplicata.

Experimento	pH	Tempo (h)
1	5 (-)	1 (-)
2	5 (-)	2 (0)
3	5 (-)	3 (+)
4	6 (0)	1 (-)
5	6 (0)	2 (0)
6	6 (0)	2 (0)
7	6 (0)	3 (+)
8	7 (+)	1 (-)
9	7 (+)	2 (0)
10	7 (+)	3 (+)

Os tubos foram agitados orbitalmente a 80 rpm em banho de gelo à temperatura controlada de 0 °C. Após os tempos determinados (1, 2 ou 3 h) as amostras foram recolhidas do sistema de rotação e centrifugadas a 4300,8 x g. Os sobrenadantes foram separados e lidos em espectrofotômetro UV a 280 nm. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

A diferença entre as leituras a 280 nm das soluções iniciais da Brosimina fração G75 e as leituras dos sobrenadantes, com a Brosimina, remanescentes das imobilizações representa a porcentagem de proteínas que ficaram retidas ao

suporte PVA-PANIG. As proteínas em solução foram quantificadas de acordo com Bradford (1976).

Os suportes PVA-PANIG-Brosimina foram lavados duas vezes com solução glicina $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e as soluções resultantes das lavagens foram recolhidas após centrifugação a $4300,8 \times g$ e lidas em espectrofotômetro a 280 nm. As matrizes PVA-PANIG-Brosimina foram então submetidas à medição da atividade da Brosimina imobilizada, como descrito no item 3.6.1.1.

Para determinar a proporção ótima lectina ofertada/quantidade de suporte utilizada, foram feitos testes de imobilização da Brosimina em diferentes concentrações. A partir da fração parcialmente purificada de Brosimina, foi preparada uma solução inicial na concentração de $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ e partindo desta solução foram preparadas soluções diluindo 50 μL , 200 μL , 350 μL , 400 μL e 600 μL da solução inicial para volume final de 1,0 mL, obtendo concentrações de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$, $120 \mu\text{g mL}^{-1}$, $210 \mu\text{g mL}^{-1}$, $240 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $360 \mu\text{g mL}^{-1}$ com tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 6. A cada 10 mg do suporte PVA-PANIG, em tubos tipo *Eppendorf*, foi adicionado 1,0 mL das soluções de Brosimina fração G75 nas concentrações citadas acima. Conduziu-se o mesmo processo de imobilização por agitação orbital a $0 \text{ }^\circ\text{C}$ citada acima e posteriormente foi feita a lavagem dos suportes com solução glicina $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A quantidade de proteínas imobilizadas foi medida de acordo com Bradford (1976) e a atividade dos suportes PVA-PANIG-Brosimina foi medida de acordo com o descrito no item 3.6.1.1.

3.6.1.1. Medida da atividade da Brosimina imobilizada

Para a medição da atividade da Brosimina imobilizada no suporte PVA-PANIG, uma solução de lactose a $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ em tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 foi incubada com o sistema PVA-PANIG-Brosimina. Esta solução teve sua concentração de lactose determinada por método de Miller (1959) antes de ser acrescida às matrizes com a lectina imobilizada. Após intervalo de tempo de 1 h, sob leve agitação (80 rpm), a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, as matrizes foram separadas do sobrenadante e este teve sua concentração de lactose determinada novamente. A diferença entre a concentração de lactose antes do contato com os suportes e depois desta interação determinou a atividade das lectinas β -galactose e lactose-específicas imobilizadas.

A medida da atividade neste teste foi realizada utilizando a capacidade de reação dos açúcares redutores com ADNS (ácido-3,5-dinitrosalicílico). O ADNS é reduzido para ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, enquanto que no caso mais simples o grupamento aldeído é oxidado a ácido aldônico (MILLER, 1959). Após 5 min de fervura, os açúcares redutores foram quantificados por espectrofotometria com comprimento de onda de 550 nm, utilizando-se uma curva padrão de lactose cuja concentração variou no intervalo de 0,18 a $1,8 \text{ mg mL}^{-1}$. A relação entre a concentração de lactose e a absorbância a 550 nm foi linear, com $r^2 = 0,9665$. As leituras das soluções iniciais foram comparadas às leituras dos sobrenadantes das imobilizações e essa diferença representou a atividade das proteínas Brosimina que ficaram imobilizadas no suporte.

3.6.1.2. Determinação das condições ótimas de imobilização para a Brosimina

Tendo sido determinado o suporte ideal para maior retenção de GA, variou-se as condições de pH e tempo (através do planejamento composto central 2²) e ainda a concentração de proteína ofertada durante os testes de imobilização. Para isso variou-se o tempo de imobilização em 1 h, 2 h e 3 h e o pH de imobilização em 5,0; 6,0 e 7,0. O tratamento estatístico dos dados gerados foi feito utilizando o programa Statistica 6.0 que delineou as superfícies de resposta dos parâmetros variados e mostrou pela análise de variância (ANOVA) se houve ou não diferença significativa entre eles.

3.6.1.3. Determinação da capacidade de reutilização do sistema PVA-PANIG-Brosimina

A determinação da capacidade de reutilização do suporte foi desenvolvida pela incubação de 10 mg do sistema PVA-PANIG-Brosimina (1,0 g de PVA / 2,5 % de solução de GA) em condições ótimas, com 1,0 mL de solução de lactose 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$, repetidas vezes até o desaparecimento da atividade. O sistema foi mantido em agitação leve (80 rpm), a 37 °C, por 1 h. Imediatamente centrifugou-se a suspensão separando-se o sistema PVA-PANIG-Brosimina-Lactose do sobrenadante com quantidade desconhecida de lactose não-ligada. A concentração da solução inicial de lactose foi comparada à sua concentração no sobrenadante e esta diferença representou a quantidade de lactose que ficou ligada ao sistema PVA-PANIG-Brosimina.

Em seguida, o precipitado PVA-PANIG-Brosimina-Lactose foi lavado com tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 e solução salina 0,15 mol L⁻¹ com o intuito de retirar da matriz as moléculas de lactose que não se ligaram

eficientemente ao suporte. Após a lavagem, foi adicionada à matriz PVA-PANIG-Brosimina-Lactose uma solução de Glicina-HCl em NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,6. Esta solução foi adicionada com o objetivo de desligar as moléculas de lactose do sistema PVA-PANIG-Brosimina para que as mesmas pudessem ser quantificadas em solução e comprovar a reutilização do suporte.

Após centrifugar o sistema PVA-PANIG-Brosimina separando-o do sobrenadante de solução glicina com as moléculas de lactose recém-desligadas, o precipitado PVA-PANIG-Brosimina foi lavado com tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 e com solução salina $0,15 \text{ mol L}^{-1}$. Após as lavagens, o suporte foi submetido a mais dois ciclos de utilização da mesma forma descrita acima.

3.6.2. Imobilização de ConA

Os íons Ca^{2+} e Mn^{2+} são cofatores necessários à atividade da ConA (AGRAW; GOLDSTEIN, 1965). Para os testes de imobilização de ConA foram adicionados ao meio reacional cloreto de cálcio $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e cloreto de manganês $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ obedecendo o tempo de incubação de 30 min a temperatura ambiente. Também foi acrescido ao meio glicose $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ com a finalidade de prevenir a imobilização das lectinas pelo sítio de ligação aos carboidratos.

Os testes de imobilização seguiram os mesmos passos dos testes de imobilização da Brosimina descritos acima. Primeiramente definiram-se as condições ótimas de pH e tempo e posteriormente confirmou-se a otimização da imobilização por testes com diferentes concentrações de lectina ofertada.

A cada 10 mg do suporte PVA-PANIG, em tubos tipo *Eppendorf*, foi adicionado 1,0 mL de solução de ConA na concentração $240 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Foi feito

um planejamento composto central 2^2 , variando pH e tempo, como é mostrado na Tabela 6.

Tabela 6. Planejamento composto central 2^2 para determinação dos parâmetros de imobilização pH e tempo da lectina ConA no suporte PVA-PANIG.

Experimento	pH	Tempo (h)
1	6 (-)	1 (-)
2	6 (-)	2 (0)
3	6 (-)	3 (+)
4	7 (0)	1 (-)
5	7 (0)	2 (0)
6	7 (0)	2 (0)
7	7 (0)	3 (+)
8	8 (+)	1 (-)
9	8 (+)	2 (0)
10	8 (+)	3 (+)

Os tubos foram agitados orbitalmente a 80 rpm em banho de gelo à temperatura controlada de 0 °C. Após os tempos determinados (1, 2 ou 3 h) as amostras foram recolhidas do sistema de rotação e centrifugadas a 4300,8 x g. Os sobrenadantes foram separados e lidos em espectrofotômetro UV a 280 nm. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata. O método de Bradford (1976) foi utilizado para a dosagem de proteínas totais. A dosagem da atividade hemaglutinante foi conduzida nos sobrenadantes das imobilizações de acordo com Moreira e Perrone (1977).

Os suportes PVA-PANIG-ConA foram lavados duas vezes com solução glicina 0,1 mol L⁻¹ e as soluções resultantes das lavagens foram recolhidas após centrifugação a 4300,8 x g e lidas em espectrofotômetro a 280 nm. As matrizes PVA-PANI-ConA foram então submetidas à medição da atividade da ConA imobilizada, como descrito no item 3.6.2.1.

Foram conduzidos testes de imobilização de ConA em diferentes concentrações: 120 µg mL⁻¹, 240 µg mL⁻¹ e 360 µg mL⁻¹, em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 8,0.

3.6.2.1. Medida da atividade das proteínas ConA imobilizadas

A lectina ConA é glicose-seletiva, isto é, tem a capacidade de distinguir glicose e manose de outros carboidratos especificamente (AGRAW; GOLDSTEIN, 1965). Por isto, para a medição da atividade desta proteína imobilizada no suporte PVA-PANIG, foi preparada uma solução de glicose a $600 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esta solução teve sua concentração determinada antes de ser acrescida à matriz com a lectina imobilizada utilizando um kit comercial de glicose oxidase. Após intervalo de tempo de 1 h, sob leve agitação (80 rpm), a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, a matriz foi separada do sobrenadante e este teve sua concentração de glicose determinada novamente. A diferença entre a concentração de glicose antes do contato com o suporte e depois desta interação determinou a atividade das lectinas imobilizadas.

A medida da atividade neste teste foi realizada utilizando um kit comercial de dosagem de glicose com base na atividade da enzima glicose oxidase (Laborclin, Brasil). A glicose oxidase liga-se à molécula de glicose gerando ácido glicurônico e peróxido de hidrogênio (INVITROGEN, 2006). Este reage com um aceptor de oxigênio formando uma cor amarelada. Esta solução colorida é lida em espectrofotômetro a 505 nm e, se comparada à leitura da solução de glicose que não teve contato com o suporte (100%), é capaz de definir a concentração de glicose retida no suporte. Foi feita uma curva de calibração do kit adotado, utilizando-se soluções de glicose nas concentrações entre 0,1 e 0,7 mg mL^{-1} . A relação entre a concentração de glicose e a absorbância a 505 nm foi linear, com $r^2 = 0,9989$.

3.6.2.2. Determinação das condições ótimas de imobilização para a ConA

O tratamento estatístico dos dados gerados foi feito utilizando o programa Statistica 6.0 que delineou as superfícies de resposta dos parâmetros de pH e tempo de imobilização variados e mostrou pela análise de variância (ANOVA) se houve ou não diferença significativa entre eles.

3.6.2.3. Determinação da capacidade de reutilização do sistema PVA-PANIG-ConA

A determinação da capacidade de reutilização do suporte foi desenvolvida pela incubação do sistema PVA-PANIG-ConA, com solução de glicose, repetidas vezes até o desaparecimento da atividade. Adicionou-se 1,0 mL de solução de glicose $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ a 10 mg do sistema PVA-PANIG-ConA (1,0 g de PVA / 2,5 % de solução de GA) imobilizado nas condições definidas como ótimas. O sistema foi mantido em agitação leve (80 rpm), a 37°C , por 1 h. Imediatamente centrifugou-se a suspensão separando-se o sistema PVA-PANIG-ConA-Glicose do sobrenadante com quantidade desconhecida de glicose não-ligada. A concentração da solução inicial de glicose foi comparada à concentração de glicose no sobrenadante e esta diferença representa a quantidade de glicose que ficou ligada ao sistema PVA-PANIG-ConA.

Em seguida, o precipitado PVA-PANIG-ConA-Glicose foi lavado com tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 e solução salina $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ com o intuito de retirar da matriz as moléculas de glicose que não se ligaram eficientemente ao suporte. Após a lavagem, foi adicionada à matriz PVA-PANIG-ConA-Glicose uma solução de Glicina-HCl em NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,6. Esta solução foi adicionada com o objetivo de desligar as moléculas de

glicose do sistema PVA-PANIG-ConA para que as mesmas pudessem ser quantificadas em solução.

Após centrifugar o sistema PVA-PANIG-ConA separando-o do sobrenadante de solução glicina com as moléculas de glicose recém-desligadas, o precipitado PVA-PANIG-ConA foi lavado com tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 e com solução salina $0,15 \text{ mol L}^{-1}$. Após as lavagens, o material foi submetido a mais um ciclo de utilização da mesma forma que o protocolo acima descrito.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. EXTRAÇÃO DA LECTINA BROSIMINA

O EB extraído das sementes de *Brosimum gaudichaudii* demonstrou a presença de proteínas na concentração de 50,23 mg g⁻¹ de farinha e atividade hemaglutinante específica de 27,87 UH mg⁻¹ de proteína. Outras espécies da família Moraceae também apresentaram lectinas; *Artocarpus integrifolia* mostrou atividade específica de 0,49 UH mg⁻¹ (MIRANDA-SANTOS et al., 1991; PEUMANS; VAN DAMME, 1995) e a frutalina proveniente da purificação de *Artocarpus incisa* apresentou atividade específica de 4100 UH mg⁻¹ de proteína (MOREIRA et al., 1997).

4.2. CROMATOGRAFIAS POR EXCLUSÃO MOLECULAR

Após a obtenção do EB da farinha de *B. gaudichaudii*, este foi aplicado a uma coluna preenchida por gel Sephadex G75 equilibrada com solução glicina 0,1 mol L⁻¹ pH 9,0. As frações de proteínas em solução obtidas desta cromatografia foram sendo lidas a 280 nm e o resultado destas leituras está demonstrado na Figura 5.

A cromatografia de exclusão molecular promove uma seleção de proteínas. Primeiramente, são eluídas da coluna as biomoléculas maiores, pois estas passam por fora do gel evitando os poros. Já as proteínas menores saem depois, pois passam pelo interior do gel, através de seus poros, sendo atrasadas de acordo com sua massa molecular.

O volume vazio calculado para a coluna foi de 20 mL. O intervalo de fracionamento do gel Sephadex G75 encontra-se entre 3 e 80 KDa. Pode-se observar que o cromatograma da coluna Sephadex G75 evidenciou três picos

(Pico 1, Pico 2 e Pico 3). Pode-se relacionar o primeiro pico às proteínas de massa molecular maior e que por este motivo foram eluídas primeiro. O segundo pico foi co-eluído com o primeiro e também está relacionado às proteínas de maior massa molecular capazes de atravessar os poros do gel.

O Pico 3 está separado do Pico 2 por uma resolução significativa e está relacionado às proteínas de massas menores presentes na amostra.

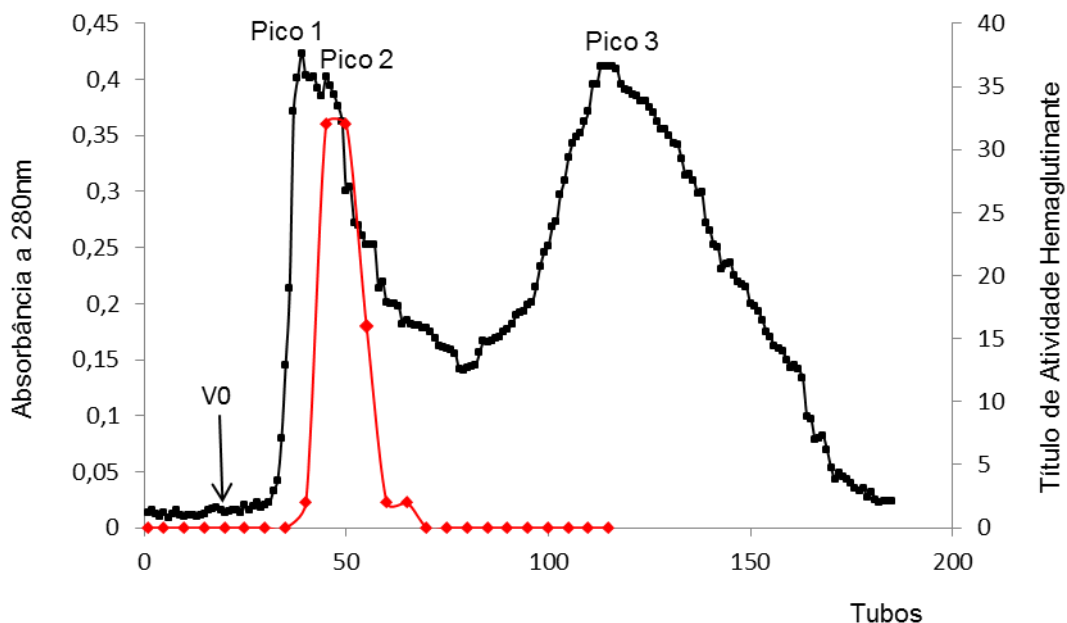


Figura 5. Cromatografia em coluna de gel Sephadex G-75. A linha em preto mostra as absorbâncias a 280 nm das frações obtidas da coluna Sephadex G75 em função do tempo. A linha vermelha mostra a atividade hemaglutinante destas frações.

Foram determinadas a quantidade de proteína total e a capacidade de hemaglutinação para as frações eluídas. Todos os tubos apresentaram proteínas, porém apenas o Pico 2 demonstrou ter atividade hemaglutinante. Esta atividade, porém, não é característica de todo o pico, mas está restrita aos tubos 50 a 90. Essa fração com atividade hemaglutinante obtida da coluna Sephadex G75 foi reunida, dialisada e liofilizada com a finalidade de ser aplicada em uma coluna de poros menores; a coluna de Sephadex G50, cujo volume vazio foi calculado

em 10 mL. O cromatograma da coluna de gel G50 (Figura 6) evidenciou apenas um pico. Este demonstrou atividade hemaglutinante nos tubos 24 ao 35.

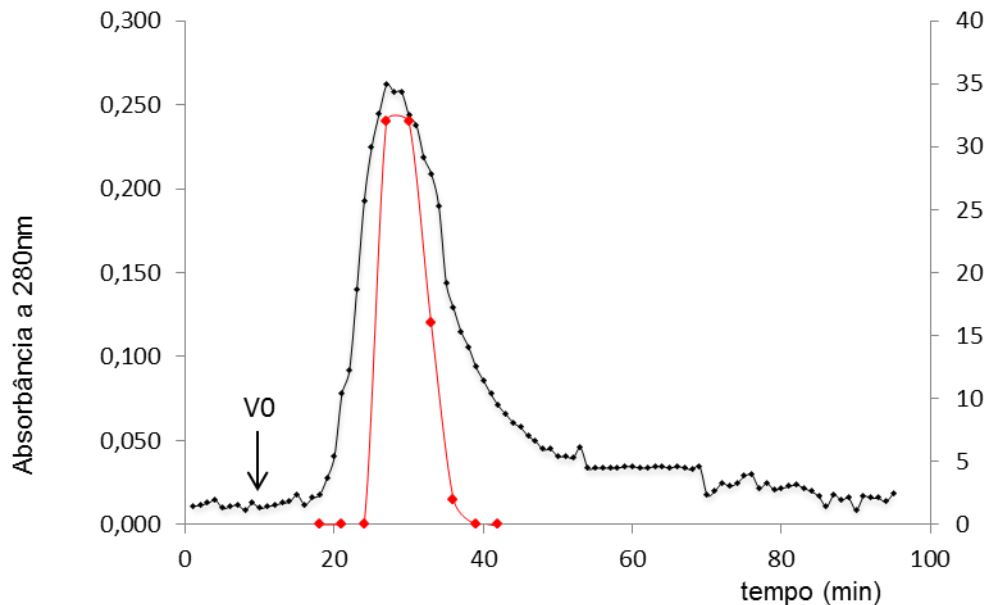


Figura 6. Cromatografia em coluna de gel Sephadex G-50.

A utilização da coluna de Sephadex G50 foi dispensada, pois não ofereceu capacidade para separar a amostra em frações de faixas de massas moleculares distintas.

Para corroborar os dados fornecidos pelas cromatografias por exclusão molecular, fez-se necessária a aplicação dessas amostras em gel de eletroforese desnaturante.

4.3. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURANTE

A eletroforese em gel SDS-PAGE, corado por azul brilhante de Comassie, revelou que as amostras parcialmente purificadas contém frações de

aproximadamente 11 KDa, 14,8 KDa e 21,35 KDa, conforme pode ser observado na Figura 7.

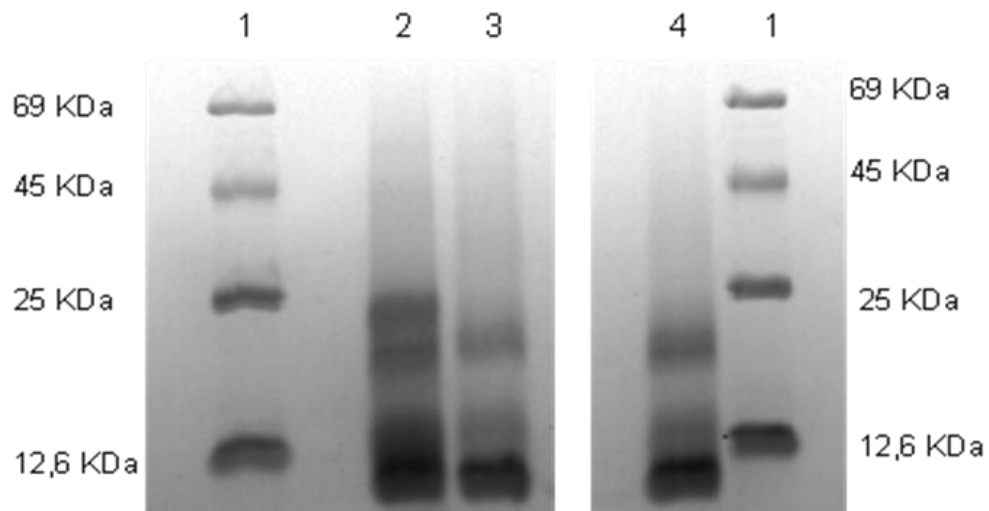


Figura 7. Eletroforese (SDS-PAGE) de lectina de *Brosimum gaudichaudii* em Sephadex G-75 e G-50. Coluna 1: marcador molecular; Albumina Sérica Bovina (69 KDa), Ovalbumina (45 KDa), Quimiotripsinogênio (25 KDa) e Ribonuclease A (12,6 KDa). Coluna 2: EB. Coluna 3: pico 1 obtido da cromatografia em coluna Sephadex G-75. Coluna 4: pico obtido da cromatografia em coluna Sephadex G-50.

As frações proteicas aplicadas nas colunas 2, 3 e 4 apresentam atividade hemaglutinante, ou seja, apresentam resultados positivos para a presença de lectinas. Esses resultados vão ao encontro dos dados de Machado (2007) que demonstrou o mesmo perfil eletroforético para a fração parcialmente purificada da coluna G-50. O gel de eletroforese apresentado acima corrobora a hipótese de que a cromatografia em coluna Sephadex G50 é dispensável, pois não houve diferença aparente de purificação entre as colunas 3 (G75) e 4 (G50).

4.4. *TESTE DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE POR AÇÚCARES*

Com a finalidade de definir a especificidade da lectina obtida pela purificação parcial através da cromatografia em Sephadex G75, foram testados os açúcares frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, sacarose e xilose. Destes, apenas a lactose e a galactose foram capazes de inibir a atividade hemaglutinante da Brosimina parcialmente purificada. A menor concentração da solução de lactose capaz de inibir a atividade hemaglutinante da Brosimina foi $0,58 \text{ mol L}^{-1}$ enquanto a menor concentração da solução de galactose que apresentou essa capacidade foi $2,2 \text{ mol L}^{-1}$.

Este resultado sugere que a Brosimina tem especificidade pelo monossacarídeo β -D-galactose (é uma lectina galactose-específica), uma vez que sua afinidade pelo dissacarídeo lactose, forma em que a galactose aparece apenas com o carbono anomérico beta, é ainda maior que pelo monossacarídeo, que em solução aquosa se comporta como uma mistura das formas alfa e beta.

Este efeito foi estudado por Lis e Sharon (1998), que observaram que a afinidade das lectinas é usualmente fraca com relação aos monossacarídeos, resultando em baixas constantes de ligação. Os resultados de seletividade, entretanto, são geralmente altos. Como a classificação das lectinas é feita de acordo com a sua especificidade por monossacarídeos (ex. lectinas manose-seletivas, galactose/N-acetilgalactosamina-seletivas, N-acetilglicosamina-seletivas, fucose-seletivas e ácido N-acetilneuramínico-seletivas) o fato de que elas possam exibir uma especificidade por oligossacarídeos maior que a especificidade por monossacarídeos fica em segundo plano. Lis e Sharon (1998) citaram lectinas com constantes de ligação até 1000 vezes maiores para oligossacarídeos do que para os respectivos monossacarídeos (LIS; SHARON, 1998).

As lectinas ligam-se aos carboidratos por uma série de interações hidrofóbicas (forças de van der Waals) e por ligações de hidrogênio. Os sítios ativos das lectinas são chamados de sítios de ligação a carboidratos e estão dispostos nessas proteínas na forma de depressões na superfície. As ligações de hidrogênio são formadas entre a carga parcial negativa dos oxigênios dos aminoácidos e os grupos amino e hidroxila dos carboidratos. As interações hidrofóbicas são formadas entre as cavidades hidrofóbicas na superfície do açúcar (formadas pela disposição estérica das hidroxilas) e as regiões hidrofóbicas da superfície da proteína (LIS; SHARON, 1998).

Várias lectinas da família Moraceae, como as extraídas de *Artocarpus integrifolia* (PEUMANS; VAN DAMME, 1995); *Artocarpus heterophyllus* (KABIR, 1995) e *Artocarpus incisa* (MOREIRA et al., 1997) apresentam especificidade por galactose. A maioria das lectinas galactose-específicas também se ligam a N-acetilgalactosamina. Em geral, as lectinas ligantes de galactose não se ligam à glicose, nem à manose. Um exemplo de lectina de planta que também demonstrou ser lactose-específica é a lectina da leguminosa *Erythrina corallodendron* (LIS; SHARON, 1998).

4.5. EFEITO DO ÁCIDO ETILENODIAMINOTETRACÉTICO E DOS ÍONS CÁLCIO E MANGANÊS NA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

A diálise da fração de Brosimina obtida da coluna Sephadex G75 contra EDTA foi conduzida com o intuito de se verificar alguma alteração na ação da lectina para possibilitar sua caracterização. O EDTA é um quelante que tem capacidade de complexar metais. Caso a lectina em questão dependa de metais, se anteriormente dialisada com EDTA, ela perde sua atividade, pois este ácido forma complexos com metais e estes não mais ficam à disposição da proteína. A lectina Brosimina, porém, não sofreu influência do EDTA no que diz respeito a

sua atividade hemaglutinante e os íons Ca^{2+} e Mn^{2+} foram desnecessários para manutenção da sua atividade. Este resultado sugere que a Brosimina não é uma metaloproteína, ou seja, não depende de cátions divalentes para exercer sua atividade. Outras lectinas da família Moraceae também não dependem de cátions divalentes para exercer sua função, pode-se citar como exemplo a lectina de *Artocarpus incisa* (MOREIRA et al., 1997).

4.6. CROMATOGRAFIAS POR BIOAFINIDADE

Para tornar a cromatografia por bioafinidade uma ferramenta útil é necessário conhecer a natureza da especificidade da lectina em questão. Os resultados de caracterização da Brosimina confirmam os de Machado (2007) e tornam possível a definição da Brosimina parcialmente purificada como uma lectina lactose/galactose específica.

A lactose é um β -galactosídeo em que um resíduo de β -1,4-glicose está ligado a um resíduo de galactose (NELSON; COX, 2011). A partir deste dado, partiu-se para mais testes de purificação da lectina Brosimina utilizando a cromatografia de bioafinidade como ferramenta principal e as gomas de α e β -galactose como fases estacionárias. Para o primeiro caso foi usada goma de *Adenantha pavonina*, conhecida popularmente por Carolina; e para o segundo caso, a goma de *Hymenaea courbaril*, o Jatobá. Estes testes visaram não só aumentar o grau de purificação da lectina, mas também determinar se esta lectina poderia ser classificada como uma proteína com seletividade anomérica, isto é, se ela demonstra seletividade diferente para os anômeros α e β da galactose.

Após as colunas de α e β -galactose terem sido montadas, as amostras da Brosimina da fração G75 foram aplicadas (em solução salina) e para que estas proteínas pudessem ser desligadas da fase estacionária, algumas fases de eluição

foram testadas. O melhor resultado foi obtido com a solução de glicina-HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,6 (Figura 8B) e vai de acordo com Garros-Rosa (2006) que isolaram as lectinas de *Artocarpus integrifolia*, *Artocarpus incisa* e *Abrus precatorius* utilizando uma coluna de galactomanana de *Parkinsonia aculeate* e a solução de eluição citada.

Após a definição da fase de eluição da cromatografia foram feitas adequações no método no intuito de obter a melhor resolução entre os picos e estabilizar a linha de base do cromatograma.

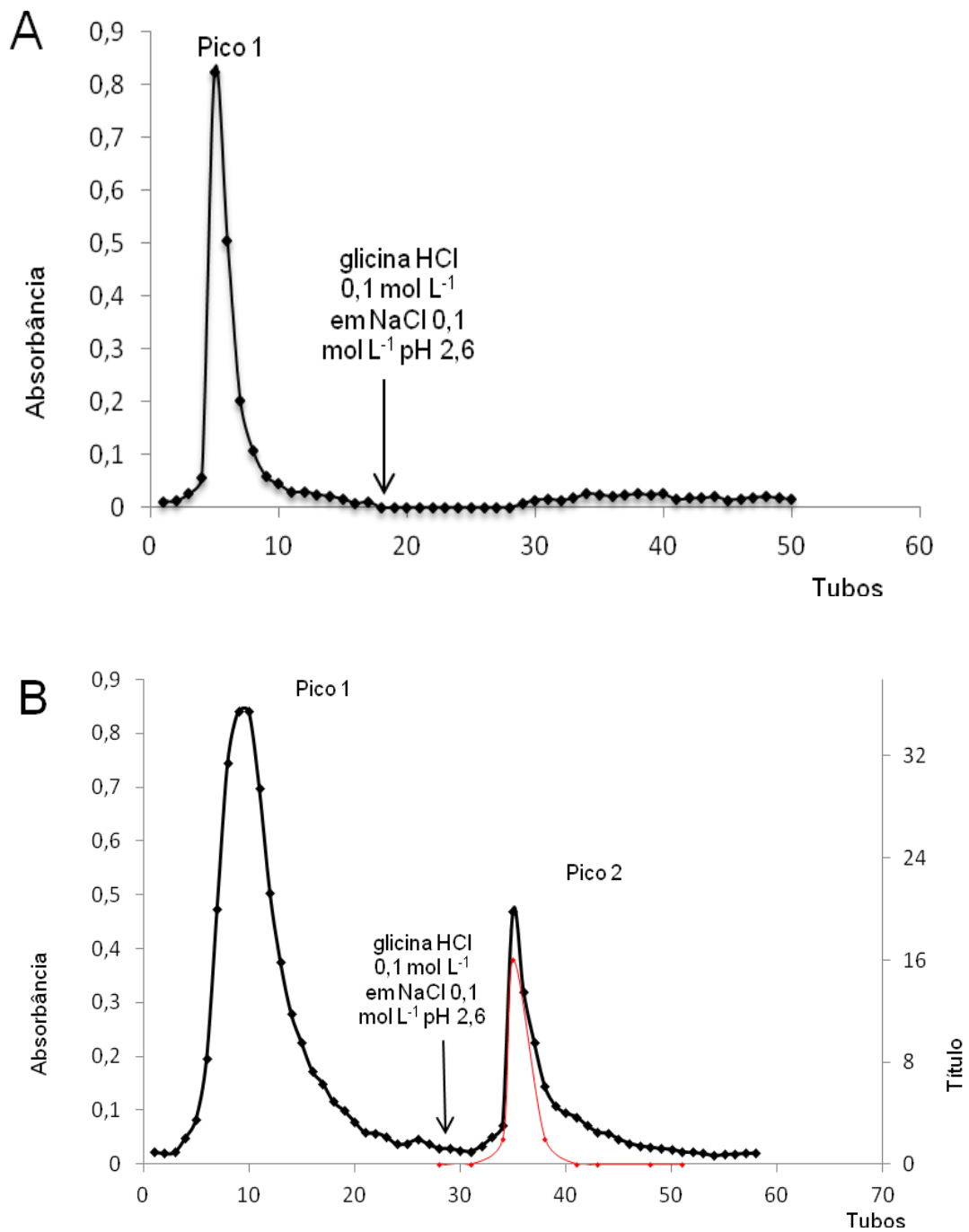


Figura 8. Perfil cromatográfico das frações (Sephadex G75) aplicadas em matriz de α -galactose (A) e β -galactose (B). O pico 1 corresponde a fração de proteínas não-ligadas eluídas com solução salina 0,1 mol L⁻¹. O pico 2, em B, corresponde a fração de lectinas retidas e eluídas com tampão glicina-HCl 0,1 mol L⁻¹ em NaCl 0,1 mol L⁻¹ pH 2,6. O volume vazio da coluna α -galactose foi de 6,0 mL e o da coluna de β -galactose foi de 4,0 mL.

A Figura 8A mostra o cromatograma da Brosimina eluída da coluna de α -galactose. O único pico obtido refere-se às proteínas não-ligadas à fase estacionária que foram eluídas em solução salina. Este pico foi eluído assim que

se alcançou o valor do volume vazio da coluna, o que corrobora a afirmação de que estas proteínas não foram capazes de se ligar eficientemente à fase estacionária. Este resultado permite excluir a hipótese de ser a Brosimina uma lectina α -galactose específica.

Observando a Figura 8B vê-se o cromatograma da Brosimina eluída da coluna de β -galactose. O Pico 1 se refere às proteínas não-ligadas à fase estacionária que foram eluídas em solução salina. Estas proteínas correspondem às lectinas em excesso na amostra (e outros contaminantes), que não foram capazes de se ligar à fase estacionária e que foram eluídas assim que se alcançou o valor do volume vazio da coluna. Porém, no cromatograma da Figura 8B foi possível observar um pico relativo às proteínas ligadas à fase estacionária da coluna: o Pico 2. Pode-se observar que apenas após a aplicação da solução de glicina-HCl 0,1 mol L⁻¹ em NaCl 0,1 mol L⁻¹ pH 2,6 é que ocorreu a eluição da fração relativa ao Pico 2. Este experimento demonstra que a Brosimina apresenta especificidade anomérica, apresentando-se como uma lectina β -galactose específica.

O Pico 2 demonstrou atividade hemaglutinante nos tubos 34 ao 38, como pode ser observado no cromatograma da Figura 8B. Isto confirma que uma fração do Pico 2 contém a lectina em questão e que esta pode ter seu fator de purificação aumentado utilizando-se uma coluna β -galactose-seletiva.

A fração do Pico 2, obtida da coluna β -galactose que apresentou atividade hemaglutinante foi reunida, dialisada e liofilizada em quantidade suficiente para a aplicação em gel de eletroforese desnaturante e não-desnaturante de forma a ser possível observar o grau de purificação da Brosimina obtida.

4.7. TABELA DE PURIFICAÇÃO

A Tabela 7 demonstra as características de cada etapa de purificação parcial da lectina Brosimina.

Tabela 7. Tabela de purificação das frações de EB, amostra eluída da coluna Sephadex G-75, da coluna Sephadex G-50 e da coluna β -galactose.

Frações	Proteína (mg g⁻¹ de farinha)	UH g⁻¹ de farinha	Atividade específica (UH mg⁻¹ proteína)	Fator de purificação	Rendi- mento (%)
EB	50,23	1400,00	27,87	1,00	100
Sephadex G75	1,21	280,00	530,30	19,02	20
Sephadex G50	0,82	140,00	681,26	24,44	10
β -galactose	0,07	175,00	2651,51	95,14	12,5

4.8. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURANTE (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel SDS-PAGE, corado por nitrato de prata, revelou que a lectina Brosimina tem subunidades de aproximadamente 11,15 KDa, conforme pode ser observado na Figura 9.

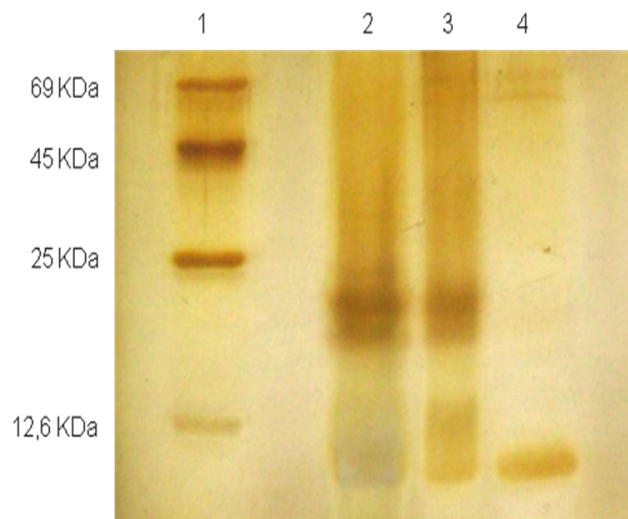


Figura 9. Eletroforese (SDS-PAGE) de lectina de *Brosimum gaudichaudii* em Sephadex G-75. Coluna 1: marcador molecular; Albumina Sérica Bovina (69 KDa), Ovalbumina (45 KDa), Quimiotripsinogênio (25 KDa) e Ribonuclease A (12,6 KDa). Coluna 2: EB. Coluna 3: fração com atividade hemaglutinante do pico 2 obtido da cromatografia em coluna Sephadex G-75. Coluna 4: fração com atividade hemaglutinante do pico 2 obtido da cromatografia em coluna β -galactose.

4.9. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NÃO DESNATURANTE

A Figura 10 apresenta um gel de eletroforese de poliacrilamida não-desnaturante que foi preparado a partir de uma amostra de EB e amostras liofilizadas obtidas das cromatografias em coluna Sephadex G75 e da coluna β -galactose.

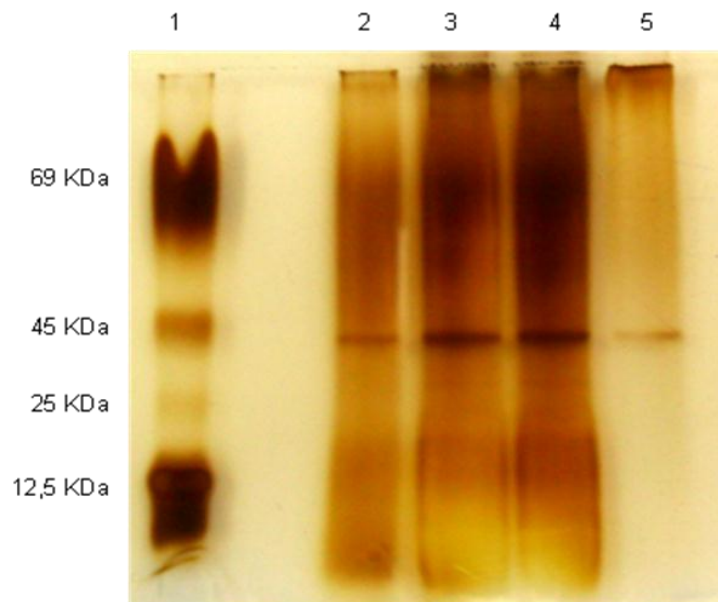


Figura 10. Eletroforese em gel não-desnaturante de lectina de *Brosimum gaudichaudii*. Coluna 1: marcador molecular; Albumina Sérica Bovina (69 KDa), Ovalbumina (45 KDa), Quimiotripsinogênio (25 KDa) e Ribonuclease A (12,6 KDa). Coluna 2: EB. Coluna 3: pico 1 obtido da cromatografia em coluna Sephadex G-75. Coluna 4: pico obtido da cromatografia em Sephadex G-50. Coluna 5: amostra eluída da coluna β -galactose.

Pode-se observar que o gel não-desnaturante apresenta uma banda única de 44,67 KDa na amostra eluída da coluna de β -galactose. Este resultado aliado ao resultado da eletroforese desnaturante que evidencia uma banda de aproximadamente 11,15 KDa pode corroborar a hipótese de que a Brosimina seja uma lectina tetramérica de massa molecular 44,67 KDa contendo subunidades idênticas de 11,15 KDa cada uma.

Quando a lectina apresenta apenas uma cadeia, como é o caso da lectina de *Solanum tuberosum* L. (ALLEN; NEUBERGER, 1973), ela é denominada monomérica. Quando apresenta duas subunidades, como a lectina de *Erythrina indica* Lam. são diméricas (KONOZY et al., 2003). Outras lectinas da família Moraceae, tais como *Artocarpus heterophyllus*, apresentam duas subunidades, uma de 15,5 KDa e outra de 12 KDa (MOREIRA; OLIVEIRA, 1983). Lectinas triméricas são raras, mas também já foram descritas (MULLER et al., 1983). A lectina jacalina (Moraceae) (PRATAP et al., 2002), é um exemplo de lectina tetramérica.

4.10. DETERMINAÇÃO DA PROPORÇÃO ÓTIMA PVA-PANIG

A técnica de imobilização de proteínas empregando GA como ativador do suporte é muito utilizada por ser simples, rápida e eficiente. Em alguns casos, a ativação por GA pode até melhorar a estabilidade da proteína através da imobilização por muitos pontos ou por várias subunidades (BETANCOR et al., 2006). A reação do GA com o suporte se dá por uma ligação entre uma extremidade aldeídica e um grupo amino ou hidroxila do suporte. É relativamente simples ativar suportes aminados com GA, desde que se tenha entre uma ou duas moléculas de GA por grupo amino. A reação deve ser controlada, pois sob condições drásticas, há polimerização do GA ligado ao suporte e a quantificação destas moléculas em solução não corresponde à quantidade real delas que está disponível para a ligação com as proteínas (MONSAN, 1978). A outra extremidade aldeídica do GA geralmente se liga aos grupamentos ϵ -amino das cadeias laterais dos resíduos de lisina da lectina conforme Figura 11 (MIGNEAULT et al., 2004).

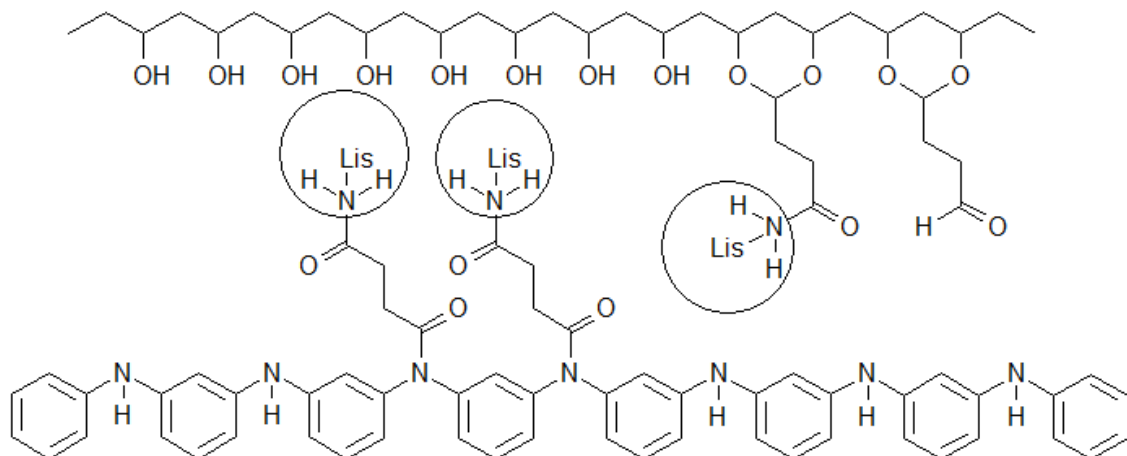


Figura 11. Rede interpenetrada PVA-PANIG. Demonstração esquemática da ligação entre as hidroxilas provenientes do PVA e as moléculas de GA; e a ligação entre o par de elétrons livres dos nitrogênios provenientes da PANI e outras moléculas de GA. As moléculas de GA funcionam como agentes de interligação entre o suporte e as lectinas imobilizadas. A lectina

se liga à molécula de GA através de uma ligação covalente entre uma extremidade aldeídica e o grupo ϵ -amino da cadeia lateral de resíduos de lisina.

O PVA pode interagir com o GA pelas hidroxilas e os grupos amino provenientes da PANI também estão disponíveis para a ligação com o GA. Assim, a quantidade de PVA e a quantidade de moléculas de GA disponíveis no meio são os parâmetros mais significativos na formação da ligação entre o GA e o suporte. Com base nestes parâmetros fez-se um planejamento de testes. Para analisar o efeito combinado das variáveis citadas acima, foi feito um delineamento experimental tipo ponto central em que a resposta é medida como a capacidade de retenção de GA nos suportes PVA-PANI, como mostra a Tabela 8.

Tabela 8. Planejamento composto central 2² da ativação de três tipos diferentes de PVA-PANI com três soluções de diferentes concentrações de GA*.

Experimento	Quantidade de PVA (g) no suporte PVA-PANI	Solução de GA (%) utilizada na ativação	Retenção de GA (%) no suporte PVA-PANI
1	0,5 (-)	1,0 (-)	45,2
2	0,5 (-)	2,5 (0)	50,6
3	0,5 (-)	4,0 (+)	55,6
4	1,0 (0)	1,0 (-)	73,2
5	1,0 (0)	2,5 (0)	84,3
6	1,0 (0)	2,5 (0)	84,3
7	1,0 (0)	4,0 (+)	86,4
8	1,5 (+)	1,0 (-)	57,7
9	1,5 (+)	2,5 (0)	61,3
10	1,5 (+)	4,0 (+)	73,5

*Todos os valores são apresentados como média de três determinações.

A análise dos valores apresentados na tabela de ANOVA (Tabela 9) indica que o modelo foi estatisticamente significativo e adequado para representar a relação entre as variáveis independentes PVA e GA em função da retenção de GA, o que pode ser confirmado pelo valor de F apresentado. O ajuste do modelo também pode ser avaliado pelo valor de r^2 que foi de 0,9655, indicando que 96,55% da variabilidade na resposta pode ser expressa pelo modelo. Isto sugere que o modelo pode representar acuradamente os dados na região que abrange o delineamento experimental. Outro dado expressivo é o valor reduzido de p, que demonstra o domínio da técnica.

Tabela 9. ANOVA. Análise de variância para retenção de GA nos suportes PVA-PANI.

Causa da variação	SQ ¹	GL ²	QM ³	F	p ⁴
(1) PVA Linear	281,38	1	281,38	35,86	0,0039
PVA Quadrático	1414,75	1	1414,75	180,30	0,0002
(2) GA Linear	259,72	1	259,72	33,10	0,0045
GA Quadrático	1,23	1	1,23	0,16	0,7127
1L por 2L	7,12	1	7,12	0,91	0,3949
Erro	31,39	4	7,85		
Total SQ	2050,32	9			

¹SQ: Soma dos quadrados; ²GL: Grau de liberdade; ³QM: Média quadrática; ⁴p: Nível de significância.

Utilizando os dados da Tabela 8 obteve-se a superfície de resposta (Figura 12) da retenção de GA em função da quantidade de PVA e da concentração de GA oferecida durante a ativação.

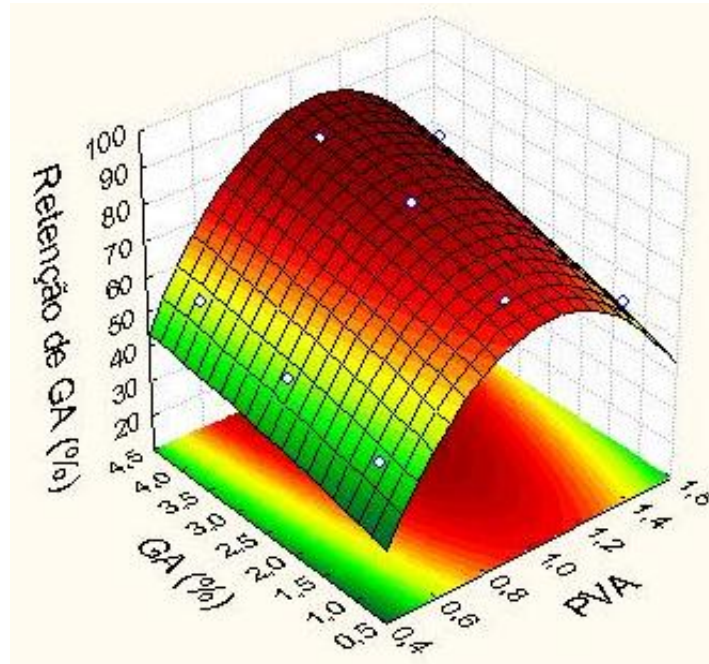


Figura 12. Superfície de resposta do planejamento composto central 2^2 relacionando a concentração de GA oferecida ao sistema de ativação e a quantidade de PVA do suporte em função da resposta em retenção de GA.

Pode-se concluir, através da análise dos dados acima, que a interação das variáveis que ofereceu maior resposta de retenção de GA foi: PVA (1,0g) *versus* GA 2,5% ou 4,0%. Dentre as duas opções apresentadas, a interação PVA (1,0 g) *versus* GA (2,5%) foi escolhida como a metodologia de ativação do suporte PVA-PANI, já que esta opção apresenta o melhor resultado de retenção de GA com o menor gasto do reagente.

A Figura 13 demonstra que o termo quadrático para a quantidade de PVA teve o efeito mais pronunciado na retenção de GA. Pode-se observar, entretanto, que este efeito é negativo: quanto menor o valor do PVA quadrático, maior a retenção de GA. Entre as variáveis significativas tem-se na sequência que os termos lineares tanto para a quantidade de PVA quanto para a quantidade de GA

são os próximos fatores mais significativos, influenciando positivamente na retenção de GA. A interação do GA linear com o PVA linear e o GA quadrático não influenciaram significativamente na retenção de GA ($p < 0,05$). Estes dados corroboram os resultados demonstrados pela superfície de resposta (Figura 12).

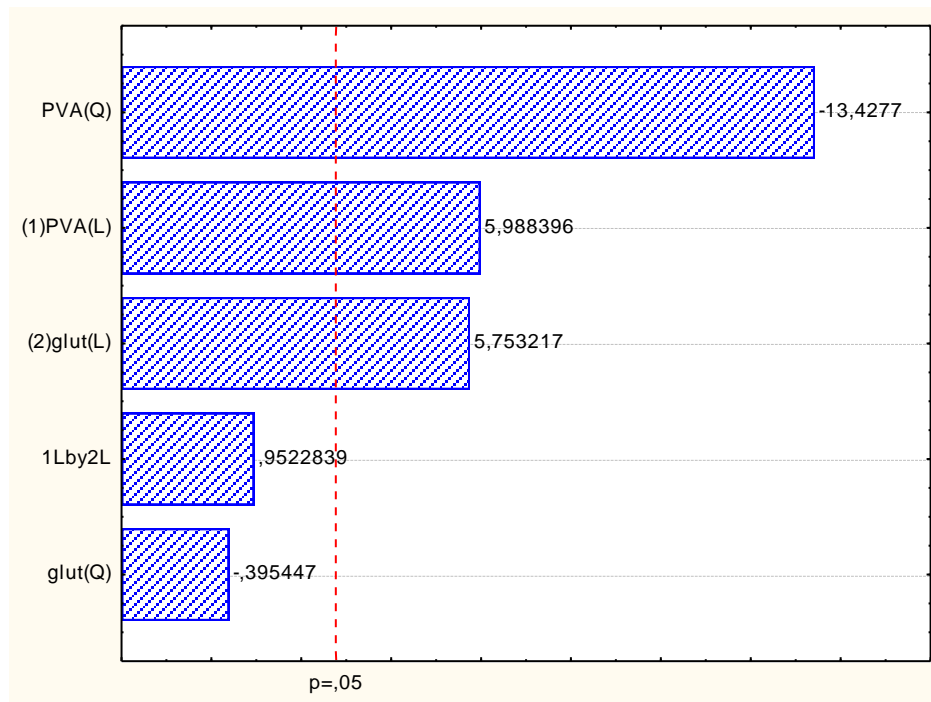


Figura 13. Gráfico de Pareto da resposta de retenção de GA em função da quantidade de PVA e da concentração de GA utilizado na ativação. PVA(Q)= PVA Quadrático; PVA(L)= PVA Linear; glut(L)= Glutaraldeído Linear; 1Lby2L= interação entre o PVA linear e o glutaraldeído; glut(Q)= Glutaraldeído Quadrático.

A superfície de resposta acima confirma os dados anteriores que afirmam ser a interação das variáveis PVA (1,0 g) *versus* GA (2,5%) a condição ótima de retenção de GA do suporte PVA-PANI.

4.11. IMOBILIZAÇÃO DE LECTINAS

Com a finalidade de submeter o suporte PVA-PANIG produzido a testes de imobilização de diferentes lectinas, foram conduzidos experimentos de imobilização tanto da lectina Brosimina, extraída de *Brosimum gaudichaudii*, quanto da lectina ConA. Para definir os parâmetros de imobilização mais

indicados para cada lectina utilizando o suporte PVA-PANIG em questão, foram feitos testes variando as condições essenciais do processo: pH e tempo de imobilização (planejamento composto central 2²) e concentração da solução da lectina a ser imobilizada. Partiu-se dos mesmos parâmetros para a condução dos testes das duas lectinas, porém os resultados mostraram que elas se comportam de maneiras diferentes no suporte; as condições ótimas de imobilização da Brosimina no suporte PVA-PANIG são diferentes das condições ótimas de imobilização da ConA neste mesmo suporte.

4.11.1. Imobilização de Brosimina

Utilizando a concentração ótima definida, foi feito um planejamento composto central variando os valores de pH e tempo em função da retenção de lactose pelo sistema PVA-PANIG-Brosimina, como mostrado na Tabela 10.

Tabela 10. Planejamento composto central 2² da ativação de três tipos diferentes de PVA-PANIG-Brosimina com três níveis de variação de pH e tempo.

Experimento	pH	Tempo (h)	Retenção de Lactose (%)
1	5,0 (-)	1 (-)	49,39
2	5,0 (-)	2 (0)	52,94
3	5,0 (-)	3 (+)	34,26
4	6,0 (0)	1 (-)	44,63
5	6,0 (0)	2 (0)	91,72
6	6,0 (0)	2 (0)	94,47
7	6,0 (0)	3 (+)	84,2
8	7,0 (+)	1 (-)	53,02
9	7,0 (+)	2 (0)	83,94
10	7,0 (+)	3 (+)	77,82

Como pode se observar pelos resultados descritos acima, a retenção de lactose é maior na condição de pH 6,0 por um tempo de 2 h.

A análise dos valores apresentados na tabela de ANOVA (Tabela 11) indica que o modelo foi estatisticamente significativo e adequado para representar a relação entre as variáveis independentes pH e tempo em função da retenção de glicose, o que pode ser confirmado pelo valor de F apresentado. O ajuste do modelo também pode ser avaliado pelo valor de r^2 indica que 80,66% da variabilidade na resposta pode ser expressa pelo modelo.

Tabela 11. ANOVA. Análise de variância para retenção de lactose nos suportes PVA-PANIG-Brosimina.

Causa da variação	SQ¹	GL²	QM³	F	p⁴
(1) pH Linear	3056,32	1	3056,32	33,72	0,0000
pH Quadrático	1960,59	1	1960,59	21,63	0,0001
(2) Tempo Linear	1212,29	1	1212,29	13,37	0,0012
Tempo Quadrático	3016,08	1	3016,08	33,27	0,0000
1L por 2L	1196,00	1	1196,00	13,19	0,0013
Erro	2175,40	24	90,64		
Total SQ	13592,60	29			

¹SQ: Soma dos quadrados; ²GL: Grau de liberdade; ³QM: Média quadrática; ⁴p: Nível de significância.

Utilizando os dados da Tabela 10 (com $r^2 = 0,8086$) obteve-se a superfície de resposta (Figura 14) da retenção de lactose em função do pH e do tempo da imobilização da solução contendo a fração parcialmente purificada da Brosimina.

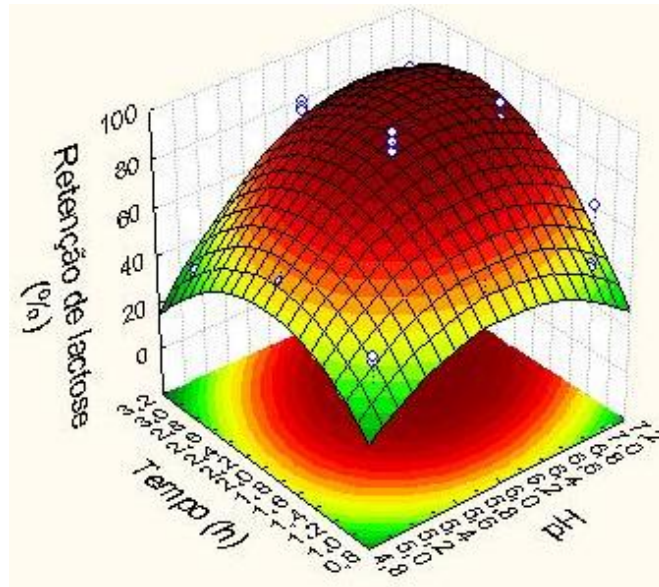


Figura 14. Superfície de resposta do planejamento composto central 2^2 relacionando o pH e o tempo de imobilização em função da retenção de lactose pelo sistema PVA-PANIG-Brosimina.

Os dados acima corroboram que a interação das variáveis que ofereceu maior resposta de retenção de lactose foi pH 6,0 *versus* tempo de 2 h. Como pode ser observado no gráfico de Pareto da Figura 15, o termo linear do pH teve o efeito mais pronunciado na retenção de glicose. Entre as outras variáveis significativas tem-se que o tempo quadrático é o segundo fator que mais influenciou na resposta, porém esta influência é inversamente proporcional à resposta. Na sequência tem-se que o termo quadrático do pH também influenciou negativamente a retenção de lactose. O tempo linear e a interação do pH linear com o tempo linear também influenciaram significativamente na resposta ($p < 0,05$). Estes dados corroboram com os resultados demonstrados pela superfície de resposta (Figura 14).

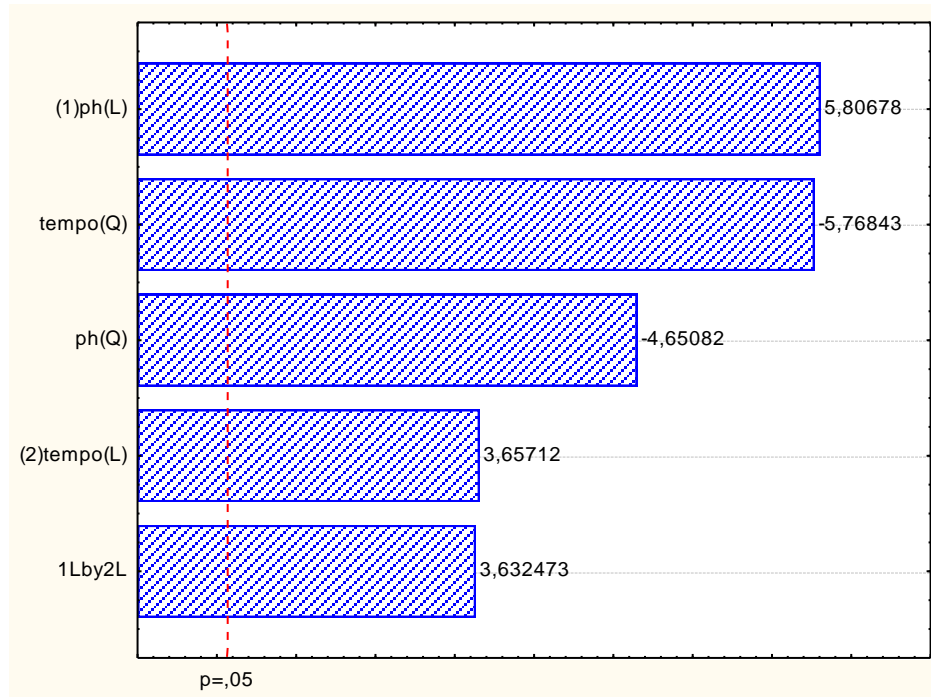


Figura 15. Gráfico de Pareto da resposta de retenção de lactose em função do pH e do tempo de imobilização. pH(L)= pH Linear; tempo(Q)= Tempo Quadrático; pH(Q)= pH Quadrático; tempo(L)= Tempo linear; 1Lby2L= interação entre o pH linear e o tempo linear.

Os resultados indicam que o pH ótimo de imobilização da Brosimina é 6,0. Além disto, pode-se afirmar que a reação entre a Brosimina e o suporte é lenta, pois o tempo linear favorece a imobilização positivamente. Esta relação pode ser explicada pela difusão da lectina através dos poros do material; estes funcionam como uma limitação química e física imposta à velocidade de difusão da lectina. Porém a influência negativa do tempo quadrático é visível a partir de 2 h e este efeito pode ser explicado analisando-se a adsorção estabelecida entre a lectina e o suporte. Se o sistema permanece muito tempo em agitação, ocorre uma diminuição da atividade porque as lectinas anteriormente adsorvidas começam a se desligar do suporte tendendo ao equilíbrio de concentração. Por este fato supõe-se ser a ligação PVA-PANI-Brosimina de dois tipos: Covalente e por adsorção. Suportes com enzimas imobilizadas tanto por adsorção quanto por ligação covalente são relativamente comuns e estão descritos na literatura (ROCHA; GONÇALVES; TEIXEIRA, 2012).

Para se confirmar que a concentração da lectina utilizada no planejamento estatístico anterior estava otimizada, foram preparadas soluções de Brosimina fração G75 em cinco concentrações diferentes e estas foram imobilizadas ao suporte PVA-PANIG. Ao comparar a capacidade de retenção de atividade dos suportes PVA-PANIG-Brosimina nas concentrações testadas observou-se que a concentração de Brosimina fração G75 ótima foi de $240 \mu\text{g mL}^{-1}$ como demonstrado na Figura 16.

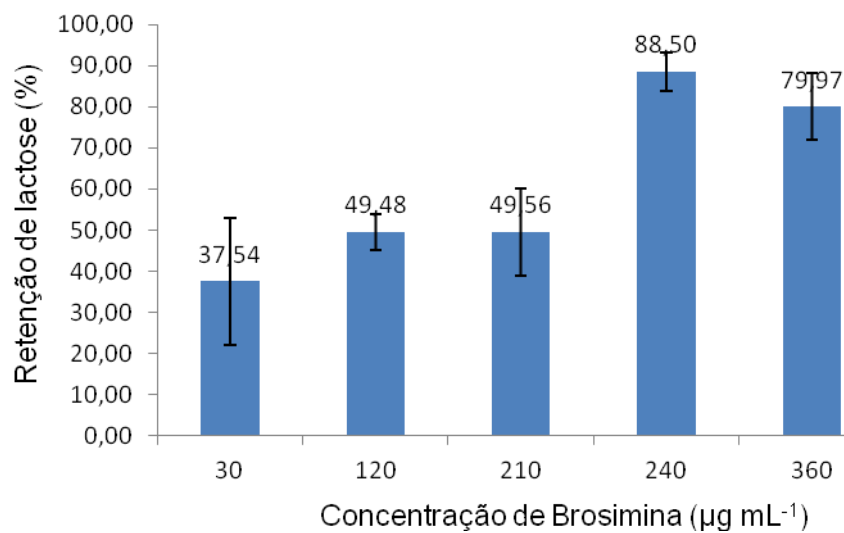


Figura 16. Relação entre a concentração de proteínas oferecidas ao suporte PVA-PANIG e a resposta em porcentagem de retenção de lactose.

O gráfico da figura acima mostra que houve aumento da atividade do suporte à medida que houve aumento na concentração da lectina ofertada. Este aumento é máximo em $240 \mu\text{g mL}^{-1}$. Este fenômeno já foi observado em Caramori et al. (2011) e por Trevan (1980) e ressalta o fato de que um aumento indefinido na quantidade de proteínas imobilizadas não implica necessariamente em maior quantidade de proteínas ativas. Este efeito pode ser explicado pela imobilização de proteínas em camadas. Assim um efeito estérico é gerado, impedindo que o substrato chegue ao sítio de ligação das proteínas causando uma diminuição da quantidade de proteínas efetivamente ativas imobilizadas (TREVAN, 1980).

O sistema PVA-PANIG-Brosimina demonstrou capacidade de ser reutilizado, sendo que 56,66% das proteínas imobilizadas ainda estavam ativas na segunda utilização do sistema. Esta porcentagem, porém, diminuiu no terceiro ciclo para 41,53% na terceira utilização. No quarto teste de utilização a atividade da Brosimina imobilizada não mais pôde ser detectada.

4.11.2. Imobilização de ConA

Após a definição das condições ótimas de imobilização para a Brosimina no suporte PVA-PANIG, partiu-se para os testes de imobilização de ConA neste mesmo suporte. Os parâmetros testados para a ConA foram os mesmos definidos para a Brosimina (pH, tempo de imobilização e concentração de lectina ofertada), porém os valores desses parâmetros se mostraram diferentes para as lectinas testadas.

Foi feito um planejamento composto central 2^2 variando os valores de pH e tempo em função da retenção de glicose, como mostrado na Tabela 12.

Tabela 12. Planejamento composto central 2^2 da ativação de três tipos diferentes de PVA-PANIG-ConA com variação de pH e tempo em três níveis.

pH	Tempo (h)	Retenção de glicose (%)
6,0 (-)	1 (-)	8,42
6,0 (-)	2 (0)	57,48
6,0 (-)	3 (+)	23,09
7,0 (0)	1 (-)	18,63
7,0 (0)	2 (0)	35,38
7,0 (0)	2 (0)	41,33
7,0 (0)	3 (+)	11,89
8,0 (+)	1 (-)	61,94
8,0 (+)	2 (0)	69,38
8,0 (+)	3 (+)	20,52

Como pode se observar pelos resultados descritos acima, a retenção de glicose é maior na condição de pH 8,0 por um tempo de 2 h. Estes dados

geraram a superfície de resposta da Figura 17 que ilustra as condições ótimas de imobilização da ConA no suporte PVA-PANIG.

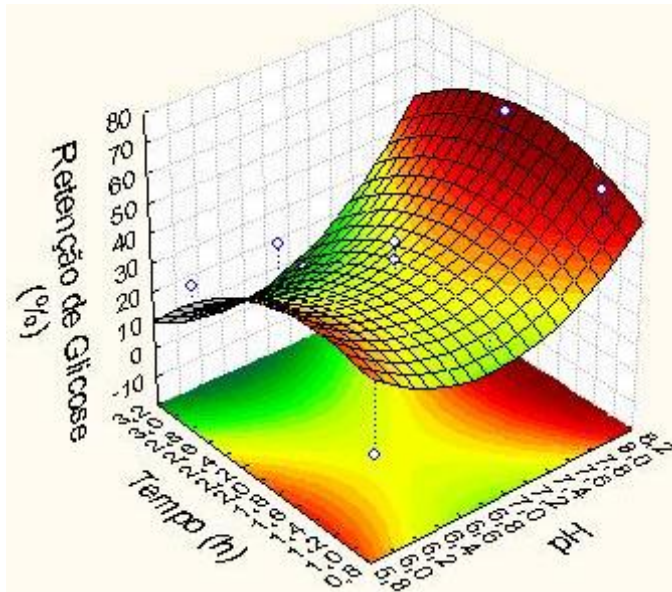


Figura 17. Superfície de resposta do planejamento composto central 2^2 relacionando o pH e o tempo de imobilização em função da retenção de glicose pelo sistema PVA-PANIG-ConA.

A análise dos valores apresentados na tabela de ANOVA (Tabela 13) demonstra que o modelo foi estatisticamente significativo com r^2 de 0,9093, indicando que 90,93% da variabilidade na resposta pode ser expressa pelo modelo.

Tabela 13. ANOVA. Análise de variância para retenção de glicose nos suportes PVA-PANIG-ConA.

Causa da variação	SQ ¹	GL ²	QM ³	F	p ⁴
(1) pH Linear	658,35	1	658,35	15,14	0,0177
pH Quadrático	782,08	1	782,08	17,98	0,0133
(2) Tempo Linear	186,93	1	186,93	4,30	0,1068
Tempo Quadrático	2080,74	1	2080,74	47,85	0,0023
1L por 2L	786,52	1	786,52	18,09	0,0131
Erro	173,94	4	43,49		
Total SQ	4313,00	9			

1SQ: Soma dos quadrados; 2GL: Grau de liberdade; 3QM: Média quadrática; 4p: Nível de significância.

Como pode ser observado no gráfico de Pareto da Figura 18, o termo quadrático para o tempo teve o efeito mais pronunciado na retenção de glicose. Pode-se observar, entretanto, que este efeito é negativo: quanto menor o valor do tempo quadrático, maior a retenção de glicose. O tempo linear não influenciou significativamente na resposta ($p < 0,05$). Um efeito semelhante a este foi observado na imobilização de Brosimina. Pode-se concluir que um tempo muito menor que 2 h não é suficiente para imobilizar o máximo de proteínas (através de ligações covalentes e adsorção); e um tempo maior que 2 h inviabiliza a imobilização da ConA pois as lectinas adsorvidas podem começar o processo inverso de desligamento já que a concentração de lectinas é menor na solução que no suporte e o sistema passa a tender para o equilíbrio.

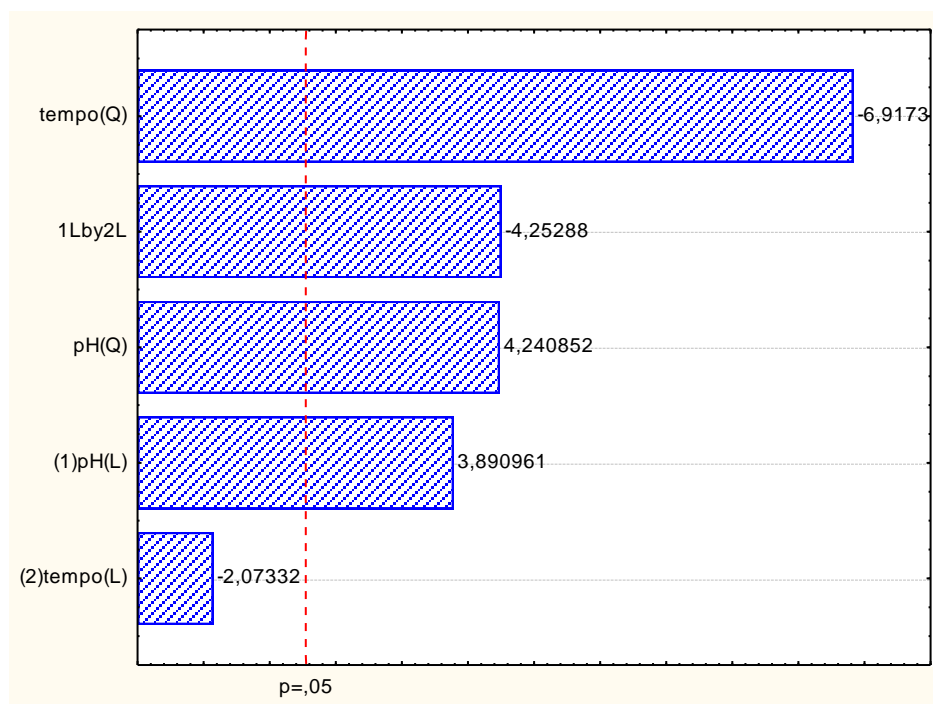


Figura 18. Gráfico de Pareto da resposta de retenção de glicose em função do pH e do tempo de imobilização. tempo(Q)= Tempo Quadrático; 1Lby2L= interação entre o pH linear e o tempo linear; pH(Q)= pH Quadrático; pH(L)= pH Linear; tempo(L)= Tempo linear.

Entre as variáveis significativas tem-se que a interação de pH linear com tempo linear também influenciou negativamente na resposta. Na sequência tem-se que os termos quadrático e linear do pH influenciaram positivamente na

retenção de glicose, diferentemente da Brosimina que foi favorecida por um pH mais baixo. O pH 8,0 favoreceu a imobilização da ConA, pois a maioria dos aminoácidos de cadeias laterais polares positivas tem pKa acima deste valor. Assim a forma ionizada facilita a formação de interações entre a proteína e o glutaraldeído. Estes dados corroboram os resultados demonstrados pela superfície de resposta (Figura 17).

A partir dos testes de otimização da razão das concentrações lectina/suporte, tem-se que a concentração utilizada para o planejamento composto central 2² foi a concentração ótima da lectina no suporte proposto. Ao comparar a capacidade de retenção de atividade de PVA-PANIG-ConA tem-se que a concentração de ConA ótima foi de 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$, como pode ser observado no gráfico da Figura 19.

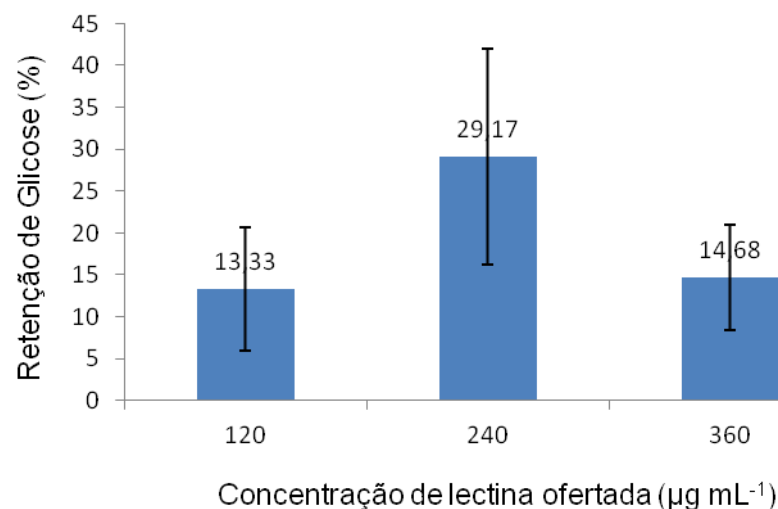


Figura 19. Relação entre a concentração de ConA oferecida ao suporte PVA-PANIG e a resposta em porcentagem de retenção de glicose.

O gráfico da figura acima mostrou que a razão lectina/suporte foi idêntica para ambas as proteínas testadas. Desta forma pode-se afirmar que o comportamento da Brosimina e da ConA com relação a difusão pelos poros do suporte é semelhante.

O sistema PVA-PANIG-ConA começou seus ciclos de utilização com 100% de atividade. Na segunda utilização, 61,52% das lectinas imobilizadas ainda estavam ativas e na terceira utilização não mais pôde ser detectada atividade da lectina imobilizada.

A capacidade de reutilização dos suportes PVA-PANIG-Brosimina e PVA-PANIG-ConA demonstrou ser mais baixa que as de alguns sistemas baseados em PVA-PANI com enzimas imobilizadas (CARAMORI; CARVALHO JR; FERNANDES, 2010; CARAMORI et al., 2011). Este resultado sugere que a imobilização das lectinas possa ter ocorrido não só por ligação covalente, mas também por adsorção. A perda da atividade entre os ciclos de utilização pode ter sido consequência das lavagens feitas entre eles, desligando assim as lectinas do suporte.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados finais demonstraram que o suporte PVA-PANIG foi útil para a imobilização de duas diferentes proteínas necessitando-se para isso apenas utilizar as condições ótimas de pH para cada uma delas. Este fato permite concluir que a rede interpenetrada de PVA-PANIG sintetizada constitui uma matriz promissora para imobilização de lectinas. Sob as condições ótimas de concentração, pH e tempo para cada lectina, a imobilização nesta matriz produziu um sistema com lectinas ativas. Por causa dessas características, o suporte PVA-PANIG se mostra como uma opção viável ao estudo dos glicoconjugados em geral.

A purificação parcial da lectina Brosimina foi obtida após uma sequência de cromatografias de exclusão molecular em gel Sephadex de tamanhos de poros distintos e de uma cromatografia de bioafinidade com fase estacionária β -específica. A eletroforese em condição não-desnaturante corroborou os dados fornecidos pelas cromatografias de que a lectina tem massa molecular 44,67 KDa. Os testes de inibição por carboidratos permitiram caracterizar a lectina Brosimina como lactose e galactose seletiva e o método de purificação desenvolvido aqui é uma ferramenta simples e de custo acessível para obtenção de glicoconjugados específicos.

6. PERSPECTIVAS

O foco deste trabalho foi propor um material polimérico de síntese simples e barata que apresentasse boa capacidade de imobilizar lectinas, fornecendo assim um suporte que venha a ser uma ferramenta útil na separação de glicoproteínas podendo ser utilizado em cromatografia de bioafinidade. O trabalho apresenta a perspectiva da imobilização de outras lectinas no material proposto e a análise dos seus parâmetros ótimos de imobilização. A fabricação de colunas cromatográficas a partir dos suportes apresentados também demonstra ser uma experiência promissora, visto que estes apresentam atividade carboidrato-seletiva comprovada.

Outra abordagem que se pode dar aos experimentos futuros chama a atenção ao estudo da lectina de *Brosimum gaudichaudii*. Esta proteína foi obtida num alto grau de pureza e sugere um padrão tetramérico de subunidades. Os resultados demonstrados aqui permitem que se dê seguimento às análises de caracterização utilizando eletroforese bidimensional.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAW, B. B. L.; GOLDSTEIN, I. J. Specific binding of concanavalin A to cross-linked dextran gels. *Biochemical Journal*. v. 96, p. 23C-25C, 1965.

AKSOY, S.; TUMTURK, H.; HASIRCI, N. Stability of α -amylase immobilized on poly(methyl methacrylate-acrylic acid) microspheres. *Journal of Biotechnology*. v. 60, p. 37-46, 1998.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKEN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Fundamentos da Biologia Celular. Porto Alegre: Editora Artmed, 2006.

ALLEN, A. K.; NEUBERGER, A. The purification and properties of the lectin from potato tubers, a hydroxyproline-containing glycoprotein. *Biochemical Journal*. v. 135, p. 307-324, 1973.

ALMEIDA, S.P. Cerrado: Aproveitamento Alimentar. 188 fls. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA-CPAC. Planaltina. 1998.

ANTHONY SAMY, S.; CHANDRAMOULI, V.; DIVAKAR, R.; RAO, P. R. V.; SUNDARARAMAN, D. PVA aided microwave synthesis: A novel route for the production of nanocrystalline thoria powder. *Journal of Nuclear Materials*. n. 231, p. 213- 220, 1996.

ARAÚJO, R. M. S.; FERREIRA, R. S.; NAPOLEÃO, T. H.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; OLIVA, M. L. V.; PAIVA, P. M. V. *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. *Plant Science*. v. 183, p. 20-26, 2012.

ARLINGHAUS, F. T.; EBLE, J. A. C-type lectin-like proteins from snake venoms. *Toxicon*. v. 60, n. 4, p. 512-9, 2012.

BHATTACHARYA, A.; DE, A. Conducting composites of Polypyrrole and polyaniline. A review. *Progress in Solid State Chemistry*. v. 24, p. 141- 181, 1996.

BERGSTROM, M.; ASTROM, E.; PAHLSSON, P.; OHLSON, S. Elucidating the selectivity of recombinant forms of *Aleuria aurantia* lectin using weak affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*. v. 885-886, p. 66-72, 2012.

BETANCOR, L.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 39, p. 877–882, 2006.

BIOCHEMICAL APPLICATIONS FOR UV/VIS SPECTROSCOPY. PerkinElmer Ltd. Beaconsfield, Buckinghamshire, United Kingdom. 2000

BORATYNSKI, J.; ZAL, T. Colorimetric Micromethods for Glutaraldehyde Determination by Means of Phenol and Sulfuric Acid or Phenol and Perchloric Acid. *Analytical Biochemistry*. v. 184, p. 259-262, 1990.

BOYD, E. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plants (agglutinins). *Science*. v. 119, p. 419, 1954.

BOYD, W.C.; REQUERA, R. M. Hemagglutinating substances for human cells in various plants. *Journal of Immunology*. v. 62, p. 333-339, 1949.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUNETON, J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes medicinales. 2 ed. Paris: Lavoisier, 1993.

CARAMORI, S. S.; CARVALHO JR, L. B.; FERNADES, K. F. Synthesis and characterization of polyvinyl alcohol/polyaniline-glutaraldehyde composite disc: a probable matrix for protein immobilization. *Revista Processos Químicos*. v. 6, p. 46-52, 2010.

CARAMORI, S. S.; FARIA F. N.; VIANA, M. P.; FERNANDES, K. F.; CARVALHO JR, L. B. Trypsin immobilization on discs of polyvinyl alcohol glutaraldehyde/polyaniline composite. *Materials Science and Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems*. v. 31, p. 252-257, 2011.

CARAMORI, S. S.; FERNANDES, K. F. Caracterização Bioquímica de frutos de *Inga alba* (Sw.) Willd. e *Inga cylindrica* Mart. (Fabaceae). *Revista Saúde e Ambiente*. v. 9, p. 16-23, 2009.

CARAMORI, S. S.; FERNANDES, K. F. Covalent Immobilization of Horseradish Peroxidase onto Poly(ethylene terephthalate)-Poly(aniline) Composite. *Process Biochemistry*. v. 39, p. 883-888, 2004.

CARAMORI, S. S.; LIMA, C. S.; FERNANDES, K. F. Biochemical Characterization of Selected Plant Species from Brazilian Savannas. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*. v. 47, n. 2, p. 253-259, 2004.

CARAMORI, S. S.; RODRIGUES, C. R.; FERNANDES, K. F. Imobilização de Enzimas In: Solemar Silva Oliveira. Ciências Moleculares. Mestrado em Ciências Moleculares, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis. v. 1, p. 147, 2011.

CHIBATA, I; TOSA, T.; SATO, T.; MORI, T. Definition of Immobilized Enzymes – In: “Immobilized Enzymes – Research and Development”. New York: John Wiley & Sons. p. 1-7, 1978.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Introdução a métodos cromatográficos. 6 ed., Editora da Unicamp, 1995.

CUMMINGS, R. D. Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York, p. 455, 1999.

DARVILLE, L. N. F.; MERCHANT, M. E.; MACCHA, V.; SIDDAVARAPU, V. R.; HASAN, A.; MURRAY, K. K. Isolation and determination of the primary structure of a lectin protein from the serum of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. v. 161, p. 161-169, 2012.

DIAZ, C. L.; MELCHERS, L. S.; HOOYKAAS, J. J.; LUGTENBERG, B. J. J.; KIJNE, J. W. Root lectin as a determinant of hostplant specificity in the Rhyzobiwn-legwne symbiosis. *Nature*. v. 338, p. 579-581, 1989.

ENDO, T. Fractionation of glycoprotein-derived oligosaccharides by affinity chromatography using immobilized lectin columns. *Journal of Chromatography A*. v. 720, p. 251-261, 1996.

FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; PINHO, H.; COLLINS, C. H. Immobilization of horseradish peroxidase onto polyaniline polymers. *Process Biochemistry*. v. 38, p. 1379-1384, 2003.

FREEZE, H.; SHARMA, V. Metabolic manipulation of glycosylation disorders in humans and animal models. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. v. 21, p. 655–662, 2010.

GARROS-ROSA, I.; REICHER, F.; PETKOWICZ, C. L. O.; SIERAKOWSKI, M. R.; MOREIRA, R. A. Characterization of the Galactomannans from *Parkinsonia Aculeata* Seeds and their Application on Affinity Chromatography. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. v. 16, n 2, p. 99-103, 2006.

GIL, E. S.; MELO, G. R. Electrochemical biosensors in pharmaceutical analysis. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 46, p. 375–391, 2010.

GOLDSTEIN, I. J.; LIENER, I. E.; SHARON, N. The Lectins: Properties, Functions, And Applications In Biology And Medicine, ed. I. E. Liener, N. Sharon and I. J. Goldstein. Academic Press. Orlando, p. 33, 1986.

HANSEL, R.; STICHER, O.; STEINEGGER, E. Pharmakognosie – Phytopharmazie, 6. Aufl. Berlin: Springer, 1999.

HEITZENEDER, S.; SEIDEL, M.; FÖRSTER-WALDL, E.; HEITGER, A. Mannan-binding lectin deficiency - Good news, bad news, doesn't matter? *Clinical Immunology*. v. 143, p. 22-38, 2012.

HERNANDEZ, K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 48, p. 107-122, 2011.

HOLMSKOV, U.; MALHOTRA, R.; SIM, R. B.; JENSENIUS, J.C. Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunology Today*. v. 15, n. 2, p. 67-73, 1994.

IHM, D. W.; KIM D. H.; NA, S. K.; PARK, J. S.; YOON K. J. Studies on the preparation of hydrolyzed starch-g-PAN (HSPAN)/PVA blend films—Effect of the reaction with epichlorohydrin. *European Polymer Journal*. v. 38, p. 1199-1204, 2002.

INVITROGEN. Amplex® Red Glucose/Glucose Oxidase Assay Kit. Molecular Probes, Inc. Paisley, UK: 2006.

JAMALA, F.; QIDWAIB, T.; SINGHA, D.; PANDEYA, P. K. Biocatalytic activity of immobilized pointed gourd (*Trichosanthes dioica*) peroxidise-

concanavalin A complex on calcium alginate pectin gel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v. 74, p. 125-131, 2012.

KABIR, S. The isolation and characterisation of jacalin [*Artocarpus heterophyllus* (jackfruit) lectin] based on its charge properties. *International Journal of Biochemistry*. v. 27, p. 147-156, 1995.

KALADAS, P. M.; KABAT, E. A.; IGLESIAS, J. L.; LIS, H.; SHARON, N. Immunochemical studies on the combining site of the d-galactose/N-acetyl-d-galactosamine specific lectin from *Erythrina cristagalli* seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 217, n. 2, p. 624-637, 1982.

KANG, G.; KIM, M. J.; KIM, J. M. Immobilization of thermostable amylase from *Bacillus stearothermophilus* for Continuous Production of Branched Oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 45, p. 4168-4172, 1997.

KAUR, M.; SINGH, K.; RUP, P. J.; SAXENA, A. K.; KHAN, R. H.; ASHRAF, M. T.; KAMBOJ, S. S.; SINGH, J. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with antiinsect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 445, p. 156–165, 2006.

KENNEDY, J. F.; WHITE, C. A. Principles of immobilization of enzymes. In: WISEMAN, A. (ed). *Handbook of enzymes Biotechnology*. New York: John Wiley and Sons. cap.4, p.147-207, 1986.

KESTWAL, R. M.; KONOZY, E. H. E.; HSIAO, C. D.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; BHADE, S.V.; Characterization of α -mannosidase from *Erythrina indica* seeds and influence of endogenous lectin on its activity. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1770, p. 24–28, 2007.

KONOZY, E. H. E.; BERNARDES, E. S.; ROSA, C.; FACA, V.; GREENE, L. J.; WARD, R. J. Isolation, purification and physicochemical characterization of a D-galactose binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. *Achives of Biochemistry and Biophysics*. v. 410, p. 222-229, 2003.

KUHLMANN, M. Frutos e sementes do Cerrado atrativos para a fauna: Guia do campo. 1ª edição, 2012. Chave Interativa disponível em: <http://frutosatrativosdocerrado.bio.br>.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. v. 227, p. 680-685, 1970.

- LANDSTEINER, K.; RAUBITSCHKE, H. Beobachtungen über Hämolyse und Hamagglutination. *Balsteriology*. 45:660-667, 1908.
- LIMPENS, E.; BISSELING, T. Signaling in symbiosis. *Plant Biology*. v. 6, p. 343–350, 2001.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemicals Reviews*. v. 98, p. 637-674, 1998.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins as Molecules and as Tools. *Annual Reviews of Biochemistry*. n. 55, p. 35-37, 1986.
- LOURENÇO, M. V. Estudo comparativo dos constituintes químicos de *Brosimum gaudichaudii* Trécul e do medicamento “V”. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara, São Paulo, 2001.
- MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; CASTRO, M. M. Mechanisms of the insecticidal action of TEL (*Talisia esculenta* lectin) against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. v. 56, p. 84–96, 2004.
- MACHADO, P. M. Isolamento, caracterização parcial e imobilização de uma lectina de *Brosimum gaudichaudii* - aplicação para remoção de lactose de leite. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Federal de Goiás, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. 2007.
- MACDIARMIRD, A. G.; EPSTEIN, A. J. Polyanilines: A Novel Class of Conducting Polymers. *Faraday Discuss. Chemical Society*. v. 88, p. 317-332, 1989.
- MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M. J.; WALDRON, K. C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*. v. 37, p. 790-802, 2004.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MIRANDA-SANTOS, I. K. F.; DELGADO, M.; BONINI, P. V.; BUNN-MORENO, M. M.; CAMPOS-NETO, A. A crude extract of *Artocarpus integrifolia* contains two lectins with distinct biological activities. *Immunology Letters*. v. 31, p. 65 – 72, 1991.

MISHKIND, M.; RAIKHELL, N. V.; PALEVITZ, B. A.; KENETH, K. Immunocytochemical localization of wheat germ agglutinin in wheat. *Journal of Cell Biology*. v. 92, p. 753-764, 1982.

MISQUITH, S.; RANI, P. G.; SUROLIA, A. Carbohydrate binding specificity of the B-cell maturation mitogen from *Artocarpus integrifolia* seeds. *Journal of Biological Chemistry*. v. 269, n. 48, p. 30393-30401, 1994.

MONSAN, P. Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. *Journal of Molecular Catalysis*. v. 3, p. 371-384, 1978.

MODY, R.; JOSHI, S.; CHANEY, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. v. 33, n. 1, p. 1-10, 1995.

MONZO, A.; BONN, G. K.; GUTTMAN, A. Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates. *Trends in Analytical Chemistry*. v. 26, n. 5, p. 423-432, 2007.

MOREIRA, R. A.; CASTELO-BRANCO, C. C.; MONTEIRO, A. C. O.; TAVARES, R. O.; BELTRAMINI, L. M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. *Phytochemistry*. v. 47, n. 7, p. 1183-1188, 1997.

MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. Lectins from the genus *Artocarpus*. *Biologia Plantarum*. v. 25, n. 05, p. 343-348, 1983.

MOREIRA, R. A.; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology*. v. 59, p. 783-787, 1977.

MU, C.; SONG, X.; ZHAO, J.; WANG, L.; QIU, L.; ZHANG, H.; ZHOU, Z.; WANG, M.; SONG, L.; WANG, C. A scallop C-type lectin from *Argopecten irradians* (AiCTL5) with activities of lipopolysaccharide binding and Gram-negative bacteria agglutination. *Fish & Shellfish Immunology*. v. 32, p. 716-723, 2012.

MULLER, W. E. G.; CONRAD, J.; SCHRODER, C.; ZAHN, R. K.; KURELEC, B.; DRESSBACH, K.; UHLENBRUCK, G. Characterization of trimeric, self-recognizing *Geodia cydonium* lectin I. *European Journal Biochemistry*. v. 133, p. 263-267, 1983.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Princípios de Bioquímica. 5 ed. São Paulo: Sarvier, 2011.

NEVES, M. L. P.; FERREIRA, N.; SILVA, S. M. S.; ARAÚJO, J. M. Ensaio para detectar bergapteno na casca e no caule de *Brosimum gaudichaudii* através da produção de melanina em actinomicetos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v 12, p. 53-54, 2002.

NUNES, E. S.; SOUZA, M. A. A.; VAZ, A. F. M.; COELHO, L. C. B. B.; AGUIAR, J. S.; SILVA, T. G.; GUARNIERI, M. C.; MELO, A. M. M. A.; OLIVA, M. L. V.; CORREIA, M. T. S. Inactivation and fragmentation of lectin from *Bothrops leucurus* snake venom by gamma irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*. v. 81, p. 484-487, 2012a.

NUNES, E. S.; SOUZA, M. A. A.; VAZ, A. F. M.; SILVA, T. G.; AGUIAR, J. S.; BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M. P.; GUARNIERI, M. C.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S. Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. *Toxicon*. v. 59, p. 667-671, 2012b.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as Plant Defense Proteins. *Plant Physiology*. n. 109, p. 347-352, 1995.

POZETTI, G. L. *Brosimum gaudichaudii* Trecul (Moraceae): da planta ao medicamento. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. v. 26, n. 3, p. 159-166, 2006.

PRATAP, J. V. ; AROCHIA, J.; RANI, P. G.; SEKAR, K.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. Crystal structures of artocarpin, a Moraceae lectin with mannose specificity, and its complex with methyl- α -D-mannose: Implication of the generation of carbohydrate specificity. *Journal of Molecular Biology*. v. 317, p. 237-247, 2002.

PULVERER, G.; BEUTH, J.; KO, H. L. Importance of Lectins for the Prevention of Bacterial Infections acid Cancer Metastases. *Zentralblatt für Bakteriologie*. v. 281, n. 3, p. 324-333, 1994.

RAMARAJ, B. Crosslinked poly(vinyl alcohol) and starch composite films. II. Physicomechanical, thermal properties and swelling studies. *Journal of Applied Polymer Science*. n. 103, p. 909-916, 2007.

RENKONEN, H. O. Studies on hemmagglutinins present in seeds of some representatives of family of leguminosae. *Annales Medicinae Experimentalis et Biologiae Fenniae*. v. 26, p. 6672-6676, 1948.

RIBEIRO, A.; CATARINO, S.; FERREIRA, R. B. Multiple lectin detection by cell membrane affinity binding. *Carbohydrate Research*. v. 352, p. 206-210, 2012.

ROCHA, C.; GONÇALVES, M. P.; TEIXEIRA, J. A. Immobilization of trypsin on spent grains for whey protein hydrolysis. *Process Biochemistry*. v. 46, p. 505-511, 2012.

SÁ, R. A.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, N. D. L.; GOMES, F. S.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H. S.; COELHO, L. C. B. B.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. *International Biodeterioration and Biodegradation*. v. 62, p. 460-464, 2008.

SAHA, P.; MAJUMDER, P.; DUTTA, I.; RAY, T.; ROY, S.C.; DAS, S. Transgenic rice expressing *Allium sativum* leaf lectin with enhanced resistance against sapsucking insect pests. *Planta*. v. 223, p. 1329-1343, 2006.

SAFINA, G. Application of surface plasmon resonance for the detection of carbohydrates, glycoconjugates, and measurement of the carbohydrate-specific interactions: A comparison with conventional analytical techniques. A critical review. *Analytica Chimica Acta*. v. 712, p. 9-29, 2012.

SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J. Galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. *Phytochemistry*. v. 48, n. 5, p. 765-769, 1998.

SANTANA, G. M. S.; ALBUQUERQUE, L. P.; NAPOLEÃO, T. H.; SOUZA, S. R.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Electrochemical potential of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin. *Bioelectrochemistry*. v. 85, p. 56-60, 2012.

SELL, A. M.; COSTA, C. P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. *Acta Scientiarum*. v. 22, n. 2, p. 297-303, 2000.

SHARON, N.; LIS, H. A century of lectin research. *Trends in Biochemical Sciences*. v. 12, p. 488-491, 1987.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. *Science*. v. 246, p. 227-234, 1989.

SILVA, K. F. F. Imobilização de horseradish peroxidase em diferentes polianilinas: Aplicações Analíticas. 2000. 138 fls. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2000.

SOUSA, R. A.; ARAUJO, O. A.; FREITAS, P. S.; DE PAOLI, M. A.. Tratamento dos resíduos gerados na síntese de polianilina em escala pré-piloto. *Química Nova*. v. 26, n. 6, p. 938-942, 2003.

SPILLER, R. C. Pharmacology of dietary fiber. *Pharmacology and Therapy*. v. 62, p. 407-427, 1994.

STEJSKAL, J.; GILBERT, R. G. Polyaniline. Preparation of a conducting polymer. *Pure and Applied Chemistry*. v. 74, n. 5, p. 857-867, 2002.

STILLMARK, H. 1888. Uben ricin, ein giftiges ferment aus samen von *Ricinus communis* l., und einigen anderen euphobiaceen. PhD Thesis. Dorpat University of Dorpat.

SUMMER, J. B. The globulins of the jack bean *Canavalia ensiformis*. *Journal of Biological Chemistry*. v. 37, p. 137-142, 1919.

TANG, J.; JING, X.; WANG, B.; WANG, F. Infrared spectra of soluble polyaniline. *Synthetic Metals*. v. 24, p. 231-238, 1988.

TREVAN, M. D. Immobilized Enzymes. New York: John Wiley & Sons, cap.2, p.12, 1980.

VILEGAS, W.; POZETTI, G. L. Coumarins from *Brosimum Gaudichaudii*. *Journal of Natural Products*. v. 56, n. 3, p.416-417, 1993.

WATKINS, W. M.; MORGAN, W. T. J. Neutralization of the anti-H agglutinin in serum by simple sugars. *Nature*. v. 169, n. 4307, p. 825-826, 1952.

VOET, D.; VOET, J.; PRATT, C. W. Fundamentos de Bioquímica. Porto Alegre: Artmed, 2002.

WEETAL, H. H. Applications of immobilized enzymes. In: MESSING, R.A. Immobilized Enzymes for Industrial Reactors, New York: Academic Press, cap.10, p. 201-226, 1975.

YANG, Z.; HANCOCK, W. Approach to the comprehensive analysis of glycoproteins isolated from human serum using a multi-lectin affinity column. *Journal of Chromatography A*. v. 1053, p. 79–88, 2004.